

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA-BEJAIA



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologies

Réf :.....

Mémoire

Présenté par

M^{elle} SALHI Melissa & M^{elle} MOKRANI Kenza

Pour l'obtention du diplôme de

Master Professionnel

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie et santé

Thème

**Etude *in vitro* de l'activité antimicrobienne d'extraits
de la pelure de grenade (*Punica granatum* L.)**

Soutenu le : 07/07/2025

Devant le Jury composé de :

M^{me} BOUDRIA A.

MCA

Président

M^{me} ABDELOUHAB K.

MCA

Encadrant

M^{me} BOUREBABA Y.

MCA

Co-encadrant

M^{me} BENACHOUR K.

MAA

Examineur

Année universitaire : 2024/2025

DÉDICACES

Au nom de Dieu, le Clément, le Miséricordieux.

Par la grâce de Dieu, ce mémoire a pu voir le jour et être mené à son terme.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont soutenue par leur amour, leur aide ou leur bienveillance tout au long de ce parcours.

Je dédie ce travail à ma famille SALHI.

À ma mère, pour son amour inconditionnel, sa force et sa patience.

À mon père, pour ses efforts silencieux, sa sagesse et son soutien.

À mes frères Lyes et Salim, ainsi qu'à vos épouses, merci pour votre présence.

À mon petit frère Sofiane, que j'aime profondément.

À mes sœurs Asma et Maïssa, mes complices au quotidien.

À mes grands-parents maternels, ainsi que ma grand-mère paternelle, que Dieu vous accorde longue vie pleine de paix et de santé.

À la mémoire de mon grand-père paternel, que Dieu l'accueille dans Son vaste paradis.

Je pense aussi à mes amis les plus chers, qui ont été là dans les bons moments comme dans les plus difficiles.

À Iyad, pour ta fidélité et ton soutien constant.

À ma binôme Kenza, pour ta collaboration, ton sérieux et ton amitié.

À Daouia, Manel et Katia, merci pour les éclats de rire, les échanges et le réconfort. Votre amitié m'est précieuse.

Je remercie également toutes les personnes rencontrées au laboratoire, pour leur aide, leurs conseils et l'ambiance de travail.

Enfin, merci à toutes celles et ceux qui ont croisé ma route pendant ces années. Chacun, à sa manière, a contribué à ce parcours.

MELISSA

DÉDICACES

À ma chère maman Louiza

Ta tendresse, ta force discrète et ton amour inépuisable ont été le fil conducteur de mon chemin.
Tu es et resteras à jamais mon repère, mon refuge et ma lumière.

À mon père adoré, Mebrouk

Ton humilité, ta sagesse tranquille et ta présence rassurante ont été pour moi une source de stabilité. Merci pour ton dévouement silencieux qui m'a appris la valeur de l'effort.

À mon unique frère, Said

Merci d'avoir toujours été là, solide et vrai, avec ta force tranquille et ton regard bienveillant. Tu es mon pilier, un repère sûr sur lequel je peux toujours compter.

À ma sœur Samira

Ta douceur et ta tendresse m'ont accompagnée dans les moments les plus difficiles. Merci pour ton amour constant, toujours aussi réconfortant.

À ma sœur Abla

Tu as été cette figure rassurante et aimante, toujours là quand j'en avais besoin. Ton amour et ta force m'ont permis d'avancer, même dans les moments les plus sombres ; À ton époux, Amar merci pour ton accueil fraternel et ta générosité. À vos filles Alicia, Assil et Ania, vos sourires, votre innocence et votre affection m'ont toujours redonné le sourire. Vous êtes mes petites étoiles.

À mon oncle

Ton regard bienveillant et ta parole mesurée ont toujours été un repère dans ma vie.

À ma tante, à ton époux, ainsi qu'à mes cousines et mon cousin,

Merci pour votre accueil, votre gentillesse et l'affection sincère que vous m'avez toujours témoignée. Votre présence, votre chaleur et vos sourires comptent beaucoup pour moi.

À mon binôme de cœur, Melissa

Plus qu'une camarade, tu es une sœur de parcours. Merci pour ta loyauté, ta patience et ton soutien indéfectible dans cette aventure commune.

À mes précieuses amies : Chahrazed, Houria, Manel et Katia

Votre amitié est un trésor inestimable. Merci pour votre présence vraie, vos mots doux, et nos rires partagés.

À tous mes amis,

Merci d'avoir été là, chacun à votre manière. Vos encouragements, votre écoute et vos attentions ont compté plus que vous ne l'imaginez.

Enfin, à toutes les familles Mokrani et Takarit,

Je vous adresse mes plus sincères remerciements pour votre présence, votre et votre soutien constant. Cette réussite est aussi la vôtre.

KENZA

REMERCIEMENT

Tout d'abord, nous remercions **Dieu**, le tout-puissant, pour nous avoir accordé la force, la patience et la volonté d'accomplir ce travail. C'est par son accompagnement que nous avons pu surmonter les obstacles et mener ce projet à terme.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadrante, **M^{me} ABDELOUHAB K.** pour son accompagnement rigoureux, ses conseils, sa patience et son engagement constant. Son soutien et ses remarques constructives ont été déterminants dans l'élaboration et la finalisation de ce travail.

Nos plus vifs remerciements vont également à **M^{me} BOUREBABA Y.** notre co-encadrante, pour sa disponibilité, ses conseils, son implication et son suivi attentif, qui ont grandement enrichi ce travail et notre réflexion.

Nous tenons également à remercier **M. BOUDJOUAN F.** adjoint du chef de département et **M. NOURI H.** chef de département de biotechnologies, pour leur disponibilité, leur appui et la confiance qu'ils nous ont accordée.

Nous remercions vivement les membres du jury, **M^{me} BOUDRIA A.** et **M^{me} BANACHOUR K.** qui ont bien voulu prendre de leur temps pour examiner ce travail.

Un grand merci à **M^{mes} IMADALOU N.** et **ADRAR K.** ingénieures de laboratoires, pour leur aide précieuse tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous exprimons toute notre reconnaissance à nos familles respectives, et en particulier aux familles **SALHI** et **MOKRANI**, pour leur soutien, leur patience et leurs encouragements constants. Leur présence silencieuse mais précieuse a été une source de motivation tout au long de ce parcours.

Nous remercions également nos amis, pour leur soutien moral, leurs encouragements, leur écoute, ainsi que pour les moments de répit et de bonne humeur partagés en période de stress.

SALHI MELISSA & MOKRANI KENZA

SOMMAIRE

Dédicaces	
Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
MATÉRIEL ET MÉTHODES	15
I. Préparation des extraits	15
II. Dosage des composés phénoliques	17
III. Évaluation de l'activité antioxydante (ABTS)	19
IV. Évaluation de l'activité antibactérienne	20
V. Évaluation de l'activité antifongique	22
VI. Analyse statistique	24
RÉSULTATS ET DISCUSSION	25
I. Rendement de l'extraction	25
II. Composition en composés phénoliques	26
III. Évaluation de l'activité antioxydante (ABTS)	31
IV. Activité antibactérienne	33
V. Activité antifongique	40
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	48
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	50
ANNEXES	

Liste des abréviations

ABTS : acide 2,2'-Azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).
ATCC : American Type Culture Collection.
ATP : Adénosine Triphosphate.
BN : Bouillon nutritif.
BS : Bouillon de Sabouraud.
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.
COX-2 : Cyclooxygénase-2.
COVID-19 : Coronavirus Disease 2019.
EAG : Equivalent en Acide Gallique.
EPG : Extrait de la pelure de grenade.
EQ : Equivalent en Quercétine.
GN : Gélose nutritive.
HAV : Hepatitis A Virus (Virus de l'hépatite A).
HSV-1 : Herpes Simplex Virus type 1.
hs-CRP : High-sensitivity C-Reactive Protein (Protéine C-réactive ultrasensible).
IL-6 : Interleukine 6.
IZD : Inhibition Zone Diameter (Diamètre de la zone d'inhibition).
LDL : Low-Density Lipoprotein (Lipoprotéine de basse densité).
LOX : Lipooxygénase.
MDA : Malondialdéhyde.
MBC : Concentration Minimale Bactéricide.
MH : Milieu Mueller-Hinton.
MPO : Myéloperoxydase.
PDA : Potato Dextrose Agar.
PG : Pelure de grenade.
RIZD : Diamètre Relatif de la Zone d'Inhibition.
SARS-CoV2 : Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2.
TAE : Tannic Acid Equivalent
TFC : Total Flavonoid Content (contenu en flavonoïdes totaux).
TBARS : Thiobarbituric Acid Reactive Substances.
TH : Tanins Hydrolysables.
TPC : Total Phenolic Content (contenu en polyphénols totaux).
Uro-A : Urolithine A.
Uro-B : Urolithine B.

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 01	Rendement des différentes méthodes d'extraction de la pelure de grenade.	25
Tableau 02	Contenu en polyphénols totaux des différents extraits de la pelure de grenade.	27
Tableau 03	Contenu en flavonoïdes des différents extraits de la pelure de grenade	29
Tableau 04	Contenu en tanins hydrolysables des différents extraits de la pelure de grenade.	30
Tableau 05	Pourcentages des diamètres relatifs des zones d'inhibition (% RIZD) des extraits de pelure de grenade sur les souches bactériennes testées.	34
Tableau 06	Pourcentages des diamètres relatifs des zones d'inhibition (% RIZD) des extraits de pelure de grenade sur les souches fongiques testées.	41

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 01	Différentes parties anatomiques du grenadier (<i>Punica granatum</i> L.)	3
Figure 02	Structures chimiques des principaux composés phénoliques de la pelure de grenade.	8
Figure 03	Schéma des trois protocoles d'extraction par infusion, macération et Soxhlet.	17
Figure 04	Courbe d'étalonnage à l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.	27
Figure 05	Courbe d'étalonnage à la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.	28
Figure 06	Courbe d'étalonnage à l'acide tannique pour le dosage des tanins hydrolysables.	30
Figure 07	Activité neutralisant le radical ABTS+• par les différents extraits de la pelure de grenade.	32
Figure 08	Zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les différents extraits de la pelure de grenade.	35
Figure 09	Pourcentages d'inhibition de la croissance de diverses souches bactériennes par les différents extraits de la pelure de grenade.	37
Figure 10	Résultats de l'analyse de l'effet bactéricide/bactériostatique des extraits de la pelure de grenade sur la croissance bactérienne.	39
Figure 11	Zones d'inhibition de la croissance des souches fongiques par les différents extraits de la pelure de grenade.	42
Figure 12	Pourcentages d'inhibition de la croissance des souches fongiques testées par les différents extraits de la pelure de grenade.	44
Figure 13	Résultats de l'analyse de l'effet fongicide/fongistatique des extraits de la pelure sur la croissance fongique.	46

Aujourd'hui, l'efficacité des antibiotiques est menacée par le phénomène croissant de résistance voire de multi-résistance bactérienne. En effet, de nombreuses bactéries ont développé des mécanismes leur permettant d'échapper à l'action des antibiotiques, rendant certains traitements inefficaces. Par exemple, certaines souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* présentent des taux de résistance supérieurs à 40% vis-à-vis de plusieurs antibiotiques de première ligne (Tacconelli et al., 2018), tandis que plus de 50% des souches de *Candida albicans* montrent une résistance croisée aux antifongiques azolés (Arastehfar et al., 2020). Cette résistance aux antimicrobiens, qu'elle soit naturelle ou acquise, met la santé publique en danger et souligne la nécessité de trouver des alternatives thérapeutiques naturelles, comme les extraits de plantes médicinales (Ain et al., 2023; Salim et al., 2023).

A cet effet, les extraits de plantes médicinales, telles que la pelure de grenade, sont considérés comme des alternatives potentielles pour lutter contre les infections microbiennes. Grâce à leurs composés bioactifs, capables d'inhiber ou de ralentir la croissance des microorganismes pathogènes, ils offrent une solution naturelle efficace et durable (Ain et al., 2023; Salim et al., 2023).

Punica granatum L. communément appelée "grenade" ou "pomme à graines", est un fruit largement cultivé à travers le monde pour sa saveur agréable, sa valeur nutritionnelle et ses nombreux bienfaits pour la santé. Classée comme un "super-fruit" (Vučić et al., 2019 ;Eghbali et al., 2021), la grenade est particulièrement riche en composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les tanins et les anthocyanes (Venat and Peticila, 2021; Siddiqui et al., 2024).

Lors de la production industrielle de jus de grenade, des quantités importantes de sous-produits, tels que les pelures, sont générées (Gullón et al., 2020). La pelure de grenade représentant environ 20 à 50% de la masse totale du fruit, a été longtemps sous-estimée, car considérée comme étant un déchet, mais aujourd'hui reconnue comme une source riche en composés bioactifs (Marra et al., 2022). Ses métabolites secondaires, en particulier les polyphénols, sont dotés d'activités biologiques potentielles, notamment antioxydante, anti-inflammatoire et antimicrobienne, leur conférant des propriétés pharmacologiques très intéressantes (Mo et al., 2022; Ain et al., 2023).

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité antimicrobienne d'extraits de pelure de grenade préparés par trois méthodes d'extraction conventionnelles, à savoir, l'infusion, la macération et Soxhlet. Ces extraits ont été testés sur plusieurs souches bactériennes, à Gram positif et négatif, ainsi que sur des champignons pathogènes. Cette approche comparative permettra d'identifier la méthode d'extraction la plus efficace pour une meilleure activité antimicrobienne des extraits de pelure de grenade.

I. *Punica granatum* L. (grenade)

I.1. Présentation botanique et caractéristiques morphologiques

Le grenadier (*Punica granatum* L.) est l'un des plus anciens arbres fruitiers connus dans le monde (**Figure 1A**). C'est un arbuste de la famille des *Lythraceae* pouvant atteindre 5 m de hauteur. Originaire d'Iran et d'Inde du Nord, le grenadier est un arbuste à longue durée de vie, pouvant produire des fruits pendant 30 à 50 ans s'il est bien entretenu (Shaygannia et al., 2016; Karimi et al., 2017; Singh et al., 2021).

Les feuilles du grenadier sont vertes, brillantes, de forme oblongue à ovale et mesurant entre 2.5 et 7 cm de long et 0.8 à 2.5 cm de large comme le montre la **Figure 1B**. A floraison estivale, le grenadier a des fleurs à pétales oblongs qui sont généralement de couleur rose pâle, mesurant jusqu'à 3 cm de diamètre, avec quatre à cinq pétales (Guerrero-Solano et al., 2020), (**Figure 1B**).

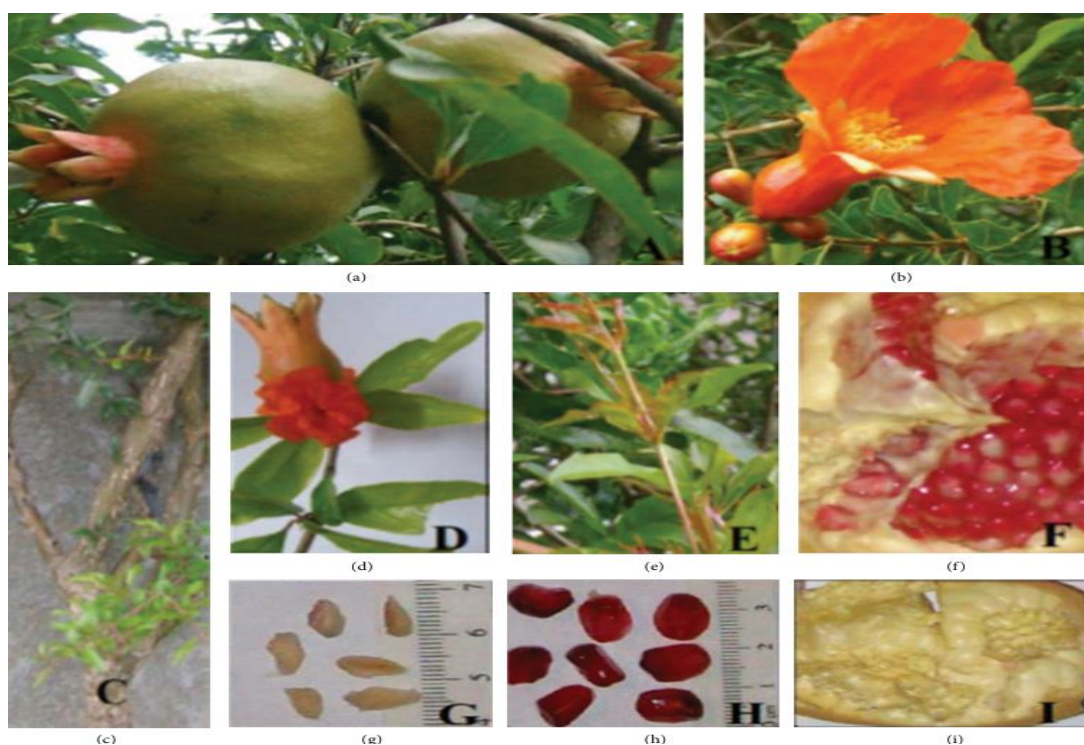


Figure 01 : Différentes parties anatomiques du grenadier (*Punica granatum* L.). (A) Fruit non mûr ; (B) Fleur ; (C) Tige ; (D) Fleur et calice tubulaire ; (E) Feuilles des extrémités des rameaux ; (F) Ecorce de fruit avec prolongements membranaires formant des compartiments contenant les arilles; (G) Graines ; (H) Arilles ; (I) Membrane interne de grenade (Rummun et al., 2013).

La grenade est un fruit de forme ronde, entouré d'une enveloppe épaisse appelée péricarpe (**Figure 1C**). Celle-ci renferme de nombreuses graines enveloppées de pulpe juteuse et translucide, appelées "arilles" (**Figure 1D**). Les arilles sont regroupés en compartiments séparés par de fines cloisons membranaires jaunes à l'intérieur du fruit (Melgarejo et al., 2020). Les arilles représentent 52% du poids total du fruit et sont composées de 78% de jus et de 22% de graines (Karimi et al., 2017). Ils peuvent être transparents, roses, rouges ou blanchâtres (Aziz et al., 2020; Melgarejo et al., 2020),

Les graines de grenade recouvertes d'arilles, représentent environ 30% du poids du fruit (**Figure 1E**). Elles constituent une source importante de lipides totaux (Melgarejo et al., 2000).

Enfin, la pelure de grenade est l'enveloppe extérieure du fruit. Robuste et épaisse, elle représente environ 20 à 50% du poids total du fruit et est généralement de couleur rouge vif, rose profond ou orange, selon la variété (**Figure 1F**). Elle présente une texture lisse et cireuse offrant une protection naturelle contre les agressions extérieures (Siddiqui et al., 2024; Ali et al., 2025).

I.2. Nomenclature et classification

I.2.1. Nomenclature

Punica granatum L. est l'appellation scientifique dérivée du latin de la grenade. Le terme grenade, provient de « *Malum granatum* », qui signifie littéralement « pomme à grains », en référence à la structure du fruit riche en graines. Le nom scientifique « *Punica granatum* » reflète également cette étymologie ; « *Punica* » provenant du mot latin « *punicus* », qui fait allusion à la Phénicie (Carthage), région d'où le fruit aurait été introduit en région méditerranéenne. Quant au terme « *granatum* », il dérive du mot latin « *granatus* », signifiant « grenu » ou « contenant de nombreuses graines » ou encore « à graines multiples » (Holland et al., 2009).

I.2.2. Classification

- **Nom commun :** Grenadier
- **Nom scientifique:** *Punica granatum* (Melgarejo et al., 2020).
- **Règne:** Plantae
- **Division:** Magnoliophyta
- **Classe:** Magnoliopsida
- **Ordre:** Myrtales
- **Famille:** Lythraceae (Punicaceae)

- **Genre:** *Punica*
- **Espèce :** *Punica granatum* L. (Shukla et al., 2025)

I.3. Origine et répartition géographique de la grenade

La grenade (*Punica granatum*. L), originaire principalement d'Iran, est l'un des premiers fruits cultivés par l'homme depuis l'antiquité (Kulkarni and Aradhya, 2005). C'est une espèce qui s'adapte à divers types de sols et de climats. Aujourd'hui, elle est cultivée dans de nombreuses régions géographiques aux hivers froids et aux étés chauds et secs, dont l'Inde, l'Afghanistan, la Chine et le Japon (Holland et al., 2009; Yuan et al., 2018). Elle est aussi bien implantée dans les pays du bassin méditerranéen et en Amérique, principalement aux États-Unis (Caliskan and Bayazit, 2012; Orhan et al., 2014).

Un large éventail de variétés est cultivé dans le monde entier, avec plus de 500 cultivars de grenades (IPGRI, 2001) parmi les plus connues : Wonderful (États-Unis), Bhagwa (Inde), Mollar (Espagne), Hicaznar (Turquie) et Messaâd (Algérie). La production commerciale de nombreux pays comme l'Italie, l'Espagne, l'Iran sont des exportateurs importants (Yuan and Zhao, 2019) et en Turquie, l'un des principaux producteurs des pays méditerranéens (Caliskan et Bayazit, 2013). En Inde, la grenade est l'un des fruits les plus importants producteurs de grenades, avec une productivité moyenne de 11.86 Tonnes/ha en raison de son faible coût, de son bon rendement, de sa bonne qualité de stockage et de sa capacité à s'adapter aux conditions d'humidité (Saroj and Kumar, 2019).

I.4. Usages traditionnels de la grenade

Punica granatum L., plus connue sous le nom de grenade, est reconnue par diverses cultures depuis des millénaires pour ses propriétés médicinales. Dans la médecine ayurvédique, elle est appelée « médicament en soi », utilisée comme tonique sanguin, agent antiparasitaire et remède contre la diarrhée et les ulcères ((Arastehfar, 2012; Malak Eddebbagh et al., 2016; Karimi et al., 2017).

Dans la médecine musulmane et persane, la grenade est recommandée pour ses effets anti-inflammatoires, cicatrisants et digestifs, ainsi que pour soulager la toux, renforcer les gencives et purifier le foie (Stover and Mercure, 2007; Darabinia et al., 2016). Elle a été employée contre les troubles gastriques, les parasites intestinaux et pour renforcer l'immunité, par la médecine traditionnelle chinoise (Harper *et al.*, 2013; Ge et al., 2021).

En Inde, la pelure et les fleurs séchées sont utilisées en infusion pour traiter les saignements de nez (épistaxis), les ulcères et les infections intestinales (Amrutesh, S, 2011).

Par ailleurs, les graines ont été utilisées à des fins médicinales, notamment pour prévenir les fausses couches et traiter les troubles urinaires (Moga et al., 2021; Wong et al., 2021).

Aujourd'hui, *Punica granatum* L. suscite un intérêt croissant dans la recherche pharmacologique pour la prévention et le traitement de diverses maladies chroniques telles que l'obésité, le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et les troubles gastro-intestinaux (Al-Muammar and Khan, 2012; Rahimi et al., 2012; Kaderides and Goula, 2019).

I.5. Composition chimique

La grenade (*Punica granatum* L.) est un fruit riche en composés bioactifs, lui conférant des propriétés thérapeutiques remarquables. Elle contient une grande diversité de composés, notamment des polyphénols, dont les flavonoïdes, les tanins et les (Venat and Peticila, 2021; Siddiqui et al., 2024).

La pelure de grenade est particulièrement concentrée en tanins hydrolysables, tels que les ellagitannins et la punicalagine. Celle-ci représentant à elle seule près de 85% des tanins totaux (Lu et al., 2008; Wu and Tian, 2017). Ces composés sont responsables d'activités antioxydantes et anti-inflammatoires marquées, conférant à la pelure des effets protecteurs contre le stress oxydant, certaines formes de cancer, ainsi que des maladies inflammatoires chroniques (Chaves *et al.*, 2020; Feng *et al.*, 2022; Hanafy *et al.*, 2021).

Les graines de grenade, pour leur part, présentent une composition biochimique riche. Elles sont principalement constituées de sucres, de vitamines, de polysaccharides, de polyphénols et de minéraux (Melgarejo *et al.*, 2000). Elles contiennent également des flavonoïdes, des anthocyanes, des acides gras, des stérols ainsi que des huiles organiques volatiles (Wang et al., 2018; Ge et al., 2021; Ko et al., 2021).

Par ailleurs, le jus de grenade constitue une autre source précieuse de composés phénoliques. Il contient des polyphénols solubles tels que les punicalagines, punicalines et ellagitannins (Guerrero-Solano *et al.*, 2020; Ge *et al.*, 2021). Il fournit également des quantités notables de potassium (K), de calcium (Ca), de phosphore (P), de manganèse (Mn), de zinc (Zn) et de cuivre (Cu) (Karimi et al., 2017).

I.5.1. Composés phénoliques

Les pelures de grenade sont riches en composés bioactifs (**Figure 02**), y compris des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins hydrolysables ayant des effets bénéfiques pour la santé de l'Homme (Feng et al., 2022; Kupnik et al., 2022).

I.5.1.1. Flavonoïdes

La pelure est riche en flavonoïdes tels que la quercétine, la rutine, les catéchines et les épicatechines, ainsi qu'en acides phénoliques comme l'acide gallique, l'acide syringique, l'acide caféique et l'acide *p*-coumarique. Ces composés sont impliqués dans les effets antimicrobiens, antimutagènes et antioxydants ((Elfalleh et al., 2011; Akhtar et al., 2015; Singh et al., 2018; Omer et al., 2019). Elle contient également des anthocyanes comme la delphinidine-3-glucoside et la cyanidine-3,5-diglucoside, qui contribuent à son activité antioxydante globale (Elfalleh et al., 2011).

La composition en flavonoïdes de la grenade évolue au cours du développement du fruit et varie selon ses variétés (Mphahlele et al., 2016) . Ces composés sont également considérés comme des phyto-œstrogènes, pouvant offrir une protection contre certains cancers hormono-dépendants (van Elswijk *et al.*, 2004). Leur concentration dans la pelure est environ 12.4 fois plus élevée que dans le jus et les graines (Kalaycıoğlu and Erim, 2017) .

I.5.1.2. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont définis par une structure combinant un noyau aromatique (phénolique) et un groupe carboxylique formant un squelette de type C6-C1. Ils sont généralement regroupés en deux grandes classes selon leur structure chimique ; les composés à squelette hydroxybenzoïques C6-C1 et ceux à squelette hydroxycinnamiques C6-C3 (Albuquerque et al., 2021). La grenade est riche en acides phénoliques, qui ont été principalement identifiés dans les pelures (Lu et al., 2008; Elfalleh et al., 2011; Kaderides and Goula, 2019). Parmi eux, les acides galloyl, ellagique, caféique, chlorogénique, butyrique, érucique, férulique et cinnamique. Leurs teneurs varient également en fonction de la zone géographique de la culture (Elfalleh et al., 2011).

I.5.1.3. Tanins

Les pelures de grenade sont riches en tanins, qui sont des composés phénoliques principalement hydrolysables, appartenant à quatre groupes ; les gallotanins, les ellagitanins, les

tanins complexes et les tanins condensés (Sieniawska and Baj, 2017). Parmi eux, la punicalagine, une ellagitannine, considérée comme composé distinctif des pelures de grenade. Ce composé est autodégradé par endoestérification ou par hydrolyse, produisant de l'acide ellagique, qui peut ensuite se polymériser en ellagitanins aux structures complexes (Caballero et al., 2022; Karimi et al., 2017).

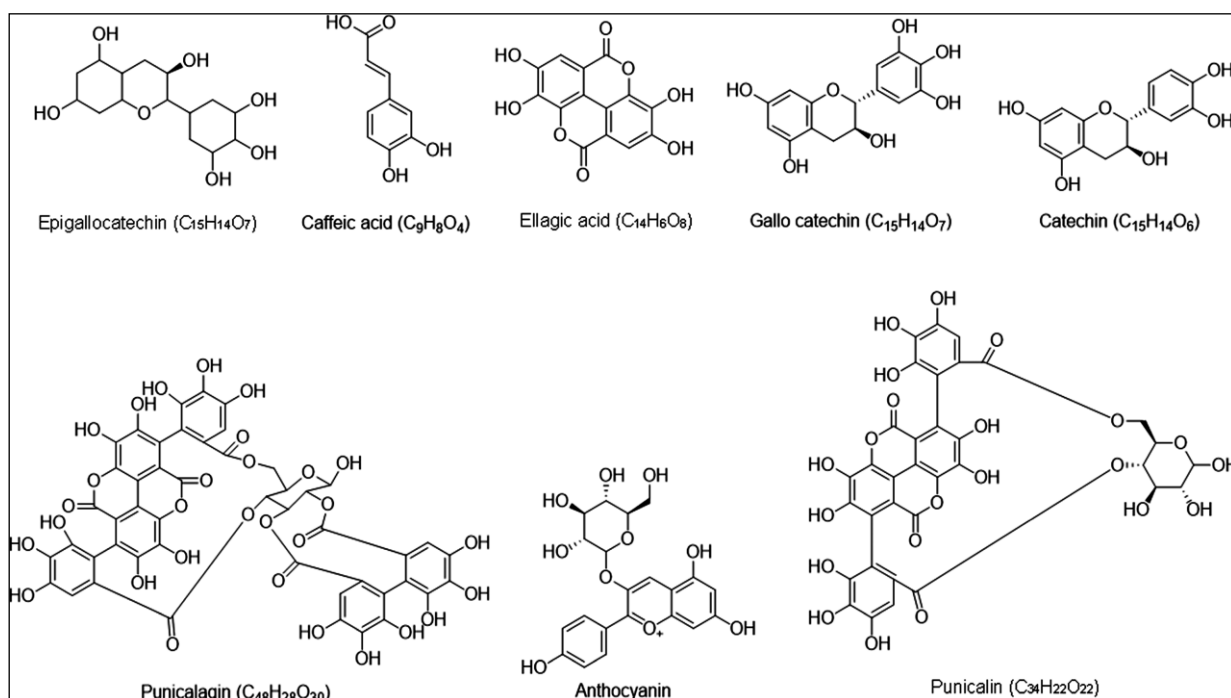


Figure 02 : Structures chimiques des principaux composés phénoliques de la pelure de grenade (Singh et al., 2023).

I.5.2. Minéraux et autres composés organiques

La pelure de grenade, longtemps considérée comme un sous-produit, s'est révélée être une source importante de minéraux essentiels. En effet, plusieurs études ont confirmé la présence de nombreux éléments minéraux, notamment le potassium (K), le calcium (Ca), le magnésium (Mg), le fer (Fe), le zinc (Zn), le cuivre (Cu) et le manganèse (Mn), en quantités variables selon la variété, le stade de maturité et les conditions de culture (Zhang et al., 2021).

Le potassium est généralement le plus abondant de ces minéraux, suivi du calcium et du magnésium, tandis que des oligoéléments comme le fer, le zinc et le cuivre sont présents en quantités plus faibles mais restent biologiquement significatifs (Muhammad et al., 2023).

En plus des minéraux, la pelure de grenade contient également divers acides organiques, principalement l'acide ellagique, l'acide citrique, l'acide acétique, l'acide gluconique, l'acide lactique et l'acide ascorbique (vitamine C) (Magangana et al., 2020). Par ailleurs, la pelure de grenade contient des acides gras essentiels tels que l'acide linoléique et l'acide punicique (Siddiqui et al., 2024). La présence de ces composés organiques améliore la stabilité chimique de l'extrait et son efficacité biologique dans les formulations médicinales et alimentaires.

Cette richesse en composés bioactifs fait de la grenade un fruit particulièrement bénéfique pour la santé humaine, en particulier pour ses effets antioxydants et son potentiel dans la prévention des maladies dégénératives (Ge et al., 2021; Siddiqui et al., 2024).

II. Propriétés biologiques et pharmacologiques

L'extrait de la pelure de grenade a été utilisé depuis l'antiquité pour traiter diverses affections, telles que l'inflammation, la diarrhée et l'infertilité (Ismail et al., 2012). Des recherches récentes mettent aujourd'hui de plus en plus en lumière des activités biologiques prometteuses de cet extrait naturel. Il s'agit particulièrement d'activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes (Magangana et al., 2021; Singh et al., 2023; Sweidan et al., 2023).

II.1. Propriétés antioxydantes

Le stress oxydant se produit lorsque les radicaux libres, des molécules réactives dérivées principalement de l'oxygène, dépassent la capacité des défenses antioxydantes naturelles. Ce déséquilibre peut endommager les cellules et favoriser le vieillissement ainsi que le développement de plusieurs maladies, comme le cancer et le diabète (Sies and Jones, 2020).

La pelure de grenade contient de nombreux antioxydants naturels dont les effets ont fait l'objet de recherches approfondies (Andrés et al., 2017). Cette puissante activité antioxydante, principalement due aux ellagitannins, a été démontrée par des études *in vitro* (Gil et al., 2000). Les ellagitannins sont transformés en urolithines, dont l'urolithine A (Uro-A) et l'urolithine B (Uro-B) (Rosenblat et al., 2015). Il a été démontré que l'Uro-A a un effet protecteur contre les dommages

oxydants induits par le cisplatine (un médicament de chimiothérapie très utilisé dans le traitement de plusieurs types de cancers) sur les reins de souris *in vivo* (Jing et al., 2019).

De plus, les extraits de pelure de grenade diminuaient les concentrations de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS), ainsi que l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL), la peroxydation lipidique et d'autres biomarqueurs du stress oxydant impliqués dans le risque cardiovasculaire tels que la myéloperoxydase (MPO). Cette enzyme est produite par les neutrophiles et favorise l'oxydation des LDL et est impliquée dans l'athérosclérose (Guo *et al.*, 2008; Gouda *et al.*, 2015; Rosenblat *et al.*, 2015).

Par ailleurs, les propriétés antioxydantes des tanins proviennent de leurs groupes phénols hydroxylés, capables de neutraliser les radicaux libres. Certains des groupes catéchol-hydroxyle présents dans les tanins complexes et condensés leur confèrent la capacité de chélater le fer et d'autres métaux de transition, renforçant ainsi leur fonction de protection contre le stress oxydant (Akhtar et al., 2015). Dans le cas des antioxydants, les tannins ont également un effet bactéricide puisqu'ils sont capables d'inhiber certaines enzymes, de précipiter les protéines membranaires, ainsi que de prélever sur les bactéries, les ions métalliques essentiels à leur développement (Ismail et al., 2012).

II.2. Propriétés anti-inflammatoires

L'inflammation est la réponse la plus importante contre l'infection pour la protection de l'organisme, permettant la réparation tissulaire et la restauration de l'homéostasie (Newton and Dixit, 2012). La réponse inflammatoire active les leucocytes qui libèrent des médiateurs inflammatoires, dont les cytokines, les amines vasoactives et les écosanoïdes (Olukunle *et al.*, 2011).

Des études ont montré que l'extrait de pelure de grenade possède des propriétés anti-inflammatoires, en utilisant un modèle animal de polyarthrite rhumatoïde. Après un traitement à une dose de 13.6 mg/kg, les niveaux d'interleukine-6 (IL-6) et d'interleukine-1 bêta (IL-1 β) ont diminué, d'où une réduction de la prévalence de l'arthrite inflammatoire (Shukla et al., 2008; Rahimi et al., 2012). Par ailleurs, l'extrait de pelure de grenade (EPG), améliorait l'état oxydatif du sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, réduisant ainsi la symptomatologie clinique ((Balbir-Gurman et al., 2011). Ces résultats ont été confirmés par un essai contrôlé randomisé. Après 8 semaines de supplémentation en EPG, une réduction considérable de l'activité de la maladie a été observée (Ghavipour et al., 2017).

L'efficacité anti-inflammatoire des extraits de grenade a été démontré par d'autres études. L'EPG réduisait l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2), l'une des principales enzymes inflammatoires (Shukla et al., 2008; Houston et al., 2017; Ifora Ifora et al., 2020). Un flavonoïde, extrait de la pelure de grenade a présenté une activité inhibitrice à la fois contre la COX et la lipooxygénase (LOX). Cette inhibition proviendrait de la nature polyphénolique du composé, qui agit par piégeage des radicaux libres contribuant ainsi à réduire l'inflammation. Chez des volontaires obèses, les extraits de pelure de grenade réduisaient les marqueurs de plusieurs maladies inflammatoires, tels que le malondialdéhyde (MDA), l'IL-6 et la protéine C-réactive hypersensible (hs-CRP) (Hosseini et al., 2016).

II.3. Propriétés antimicrobiennes

Plusieurs études ont montré que la pelure de grenade (PG) possède des effets antimicrobiens envers une grande variété de bactéries et de champignons. Il s'agit d'une source antimicrobienne non toxique et efficace (Alexandre et al., 2019; Singh et al., 2018) .

II.3.1. Activité antibactérienne

Les extraits de pelure de grenade sont étudiés pour leurs propriétés antibactériennes contre divers pathogènes (Ismail et al., 2012). Des études *in vitro* ont montré une inhibition significative des bactéries pathogènes, en particulier les Gram positif, car ces dernières n'ont pas de membrane externe d'où la capacité des composés tanniques à précipiter les protéines, ce qui provoque une destruction de la membrane cellulaire des microorganismes qui conduit à la mort cellulaire (Panichayupakaranant et al., 2010; Fawole et al., 2012).

À l'échelle moléculaire, les activités antimicrobiennes des tanins sont largement reconnues. Ces composés ont démontré une capacité d'inhibition sur la croissance de nombreux microorganismes, y compris des champignons, des levures et des bactéries. Des études ont notamment montré que certains tanins, comme l'acide tannique et le gallate de propyle, exercent une activité inhibitrice contre des bactéries d'origine alimentaire, ainsi que des microorganismes responsables d'odeurs ou de goûts désagréables (Lobiuc et al., 2023).

L'activité antibactérienne de l'extrait de pelure de grenade a été démontrée contre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Yersinia pestis* (Al-Zoreky, 2009) . L'extrait de pelure de grenade, contenant 13% d'acide ellagique, inhibait la croissance de *Propionibacterium acnés*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* par la liaison aux

protéines membranaires, entraînant une perte de perméabilité, des fuites cellulaires et la lyse cellulaire (Al-Zoreky, 2009; Panichayupakaranant et al., 2010). De même, les films d'emballage enrichis d'extrait de pelure de grenade ont montré une inhibition efficace contre *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* et *Salmonella* (Hanani et al., 2019).

Les punicalagines, des composés présents dans les extraits bruts de pelure de grenade, inhibent la croissance de *Streptococcus mutans*, une bactérie cariogène, après 6 heures d'exposition. Ce résultat suggère une application potentielle dans la prévention des caries dentaires (Gulube and Patel, 2016).

Des extraits méthanoliques de pelure de grenade ont montré une efficacité significative contre les bactéries pathogènes telles que *Shigella dysenteriae* sérotype 2, *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* (Juneja et al., 2016; Smaoui et al., 2019). Par ailleurs, une étude menée par (George et al., 2019) a évalué l'effet de l'administration d'un extrait de pelure de grenade (EPG) à des souris infectées par *Citrobacter rodentium*, une bactérie étroitement liée à *E. coli* utilisée comme modèle pour étudier les infections gastro-intestinales humaines. Les résultats ont révélé que le traitement par l'EPG réduisait significativement la pathogénicité de l'infection, ce qui suggère que les polyphénols présents dans la pelure de grenade pourraient être bénéfiques dans le traitement des troubles intestinaux.

Les composés bioactifs présents dans ces extraits, tels que certains tanins et acides phénoliques, peuvent perturber les membranes des cellules bactériennes, entraîner une acidification du cytoplasme et dans certains cas, conduire à la mort cellulaire (Sanchez-Maldonado et al., 2014).

II.3.2. Activité antivirale

La popularité de la grenade a augmenté en raison de ses effets antiviraux bien connus (Kharchoufi et al., 2018). A titre d'exemple, l'inhibition du virus de la grippe, attribuée à l'inhibition de la réplication de l'ARN de ce virus, constitue une avancée importante dans la mise en évidence de la capacité antivirale de la pelure de grenade. L'activité inhibitrice de certains composés comme la punicalagine se produit à des concentrations allant jusqu'à 40 mg/ml (Haidari et al., 2009).

Par ailleurs, le SRAS-CoV2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) est apparu très récemment comme agent pathogène hautement contagieux, à l'origine de la maladie à coronavirus

(COVID-19), avec un taux de létalité de 3% aux débuts (Janvier-Février 2020) de l'épidémie (Kumar, 2021). L'hypothèse actuelle est que les métabolites secondaires isolés à partir de fruits et légumes fournissent une certaine activité antivirale contre la COVID-19 (Islam et al., 2020). La punicaline et les punicalagines ont été identifiées comme exerçant des effets atténuants sur la capacité de liaison de la glycoprotéine S du virus à des récepteurs spécifiques sur les cellules hôtes. De plus, des affinités et des interactions de l'acide gallique, de l'acide ellagique, de la punicalagine et de la punicaline de l'extrait de pelure de grenade envers quatre cibles protéiques choisies en fonction du processus d'entrée virale dans une cellule hôte, ont été démontrées. Les cibles étaient la glycoprotéine de pointe du SARS-CoV-2, l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 et la protéase transmembranaire du SARS-CoV-2 (Suručić et al., 2021; Valero-Mendoza et al., 2023).

L'extrait de pelure de grenade a également montré une activité antivirale contre le virus de l'hépatite A (HAV) et le virus de l'herpès type 1 (HSV-1), où il était capable d'inhiber sa réplication et de réduire la charge virale dans les cellules infectées. Cette efficacité est attribuée à la richesse en composés phénoliques, tels que les punicalagines, capables de perturber les étapes initiales de l'infection virale (Zakzouk et al., 2024).

II.3.3. Activité antifongique

La pelure de grenade contient de puissants composés antifongiques, notamment des polyphénols et des tanins, qui peuvent constituer une alternative aux antifongiques synthétiques (Tehranifar et al., 2011). Les tanins contenus dans l'extrait de pelure de grenade sont d'une importance capitale pour contrôler la croissance des champignons pathogènes, et la punicalagine a été identifiée comme le composé clé responsable de l'activité antifongique (Endo et al., 2010a).

Les extraits de pelure de grenade ont montré une inhibition de la croissance de divers dermatophytes, à savoir *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, et *Microsporum gypseum*. L'inhibition a été observée au stade conidies et hyphes, avec des concentrations minimales inhibitrices de 25-250 mg/ml, en fonction de l'espèce fongique (Foss et al., 2014).

Une activité antifongique notable contre *Candida albicans*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* et *Coniella granati*, a été rapportée. L'inhibition fongique a été dose-dépendante, avec des concentrations minimales inhibitrices comprises entre 6.25 et 50 μ M. La punicalagine a été démontré comme étant le composé le plus actif (Brighenti et al., 2021).

II.3.4. Activité antiparasitaire

La grenade se distingue également par ses propriétés antiparasitaires, grâce auxquelles, la grenade a été utilisée depuis des siècles pour traiter les problèmes intestinaux causés principalement par *Giardia lamblia* (El-Kady et al., 2021), et *Blastocystis* (Abdel Hafeez and Ahmed, 2016; Zuhair Dardona, 2023)

Des études récentes ont mis l'accent sur les effets de la pelure de grenade sur divers parasites. Par exemple, l'étude menée par (El-Kady et al., 2021) a démontré que l'extrait de pelure de grenade présentait une activité antiparasitaire significative contre *Giardia lamblia in vitro*. L'extrait a entraîné une altération de la viabilité et de la structure des trophozoïtes, avec une inhibition dose-dépendante. Une autre étude, réalisée par (Elkoraichi et al., 2025), a montré que l'administration d'un extrait méthanolique de pelure de grenade à des souris infectées par *Toxoplasma gondii* réduisait considérablement la charge parasitaire dans les tissus cérébraux et hépatiques, suggérant un effet protecteur marqué et un potentiel thérapeutique contre les infections à protozoaires. D'autres recherches ont exploré le potentiel de la pelure de grenade pour lutter contre les parasites vétérinaires. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* ont révélé l'efficacité d'extraits de pelure de grenade chez des bovins et ovins naturellement infectés par des nématodes gastro-intestinaux, observant une réduction significative de la charge parasitaire (Abdel Hafeez and Ahmed, 2016; Castagna et al., 2022; Kaiaty et al., 2021)

I. Matériel biologique

I.1. Pelures de *Punica granatum* L.

Cette étude a été réalisée sur les pelures de grenade (*Punica granatum* L.), collectées à partir de fruits achetés dans les commerces de la ville de Béjaïa durant la période d'octobre à novembre 2022. Après consommation du fruit, les pelures ont été récupérées, puis séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière, pendant quelques semaines. Une fois bien sèches, elles ont été broyées jusqu'à obtention d'une poudre fine. Cette poudre a ensuite été tamisée ($\varnothing = 250 \mu\text{m}$) puis conservée dans des bocaux en verre hermétiquement fermés, étiquetés et stockés à $+4^{\circ}\text{C}$, pour une utilisation ultérieure.

I.2. Souches bactériennes et fongiques utilisées

Les extraits de pelure de grenade ont été testés pour leur activité antimicrobienne contre un certain nombre de microorganismes, incluant des souches de référence bactériennes Gram-positif, à savoir, *Staphylococcus aureus* ATCC 6314^T, *Bacillus cereus* ATCC 10876^T, *Bacillus subtilis* ATCC 6633^T, mais aussi des Gram-négatif comme *Escherichia coli* ATCC 25922_T, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028_T, et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031_T. Des champignons pathogènes dont *Candida albicans* ATCC 1024^T, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. et *Alternaria* sp. ont été également utilisés à cet effet.

II. Méthodes

II.1. Préparation des extraits

La poudre obtenue à partir des pelures de grenade a été soumise à trois méthodes d'extraction conventionnelles, dont l'infusion, la macération et Soxhlet (**Figure 3**). Chaque méthode a été réalisée en triplicate afin d'assurer la reproductibilité des résultats.

II.1.1. Extraction par Soxhlet

L'extraction par Soxhlet a été réalisée dans l'éthanol (70%) selon la méthode décrite par (Ali and Kumar, 2014). La poudre de pelure de grenade (10 %, m/v) a été introduite dans une cartouche placée dans le dispositif Soxhlet (Behr), tandis que le solvant a été placé dans le ballon d'extraction. Trois extractions ont été réalisées (S1/S2/S3) à 60°C pendant 5h (9 cycles). À la fin de l'extraction le solvant contenant l'extrait de pelure de grenade a été récupéré puis séché à l'étuve à 50°C pendant 48 heures. L'extrait obtenu a ensuite été récupéré dans des flacons bien fermés et conservé à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

II.1.2. Extraction par infusion

Conformément à la méthode décrite par (haj et al., 2018), la poudre de pelure de grenade a été ajoutée dans un volume d'eau distillée (10%, m/v), portée à ébullition sur une plaque chauffante agitatrice (VELP® Scientifica AM4 Multiple Heating Magnetic Stirrer). Après infusion, sous agitation pendant 10 min, la solution a été répartie dans des tubes à essai placés dans une centrifugeuse (SIGMA), puis centrifugée à 3000 rp m/min pendant 5 min. Le surnageant a ensuite été filtré sur du papier filtre et le filtrat obtenu a été mis à sécher à l'étuve (50°C) jusqu'à évaporation complète de l'eau. Enfin, l'extrait sec a été récupéré dans des récipients opaques hermétiquement fermés, et conservé à l'abri de la lumière jusqu'à analyse.

II.1.3. Extraction par macération

L'extraction par macération a été adaptée de la méthode décrite par (Ranjha et al., 2020). Dans un erlenmeyer, une masse de 20 g de poudre obtenue à partir des pelures de grenade a été mélangée à un volume d'éthanol (70%) à un ratio de 10% (m/v). Les erlenmeyers ont été bouchés, puis placés dans un bain-marie (Memmert) à 60°C sous agitation pendant 5 h. Après refroidissement, le mélange a été transféré dans des tubes Falcon® et centrifugé à 3000 rpm/min pendant 5 min. Le surnageant récupéré a été filtré à l'aide de papier filtre. Le filtrat obtenu a ensuite été versé dans des boîtes de Pétri, puis placé dans une étuve à 50°C jusqu'à séchage complet. L'extrait sec obtenu a été conservé dans trois flacons bien fermés jusqu'à son utilisation.

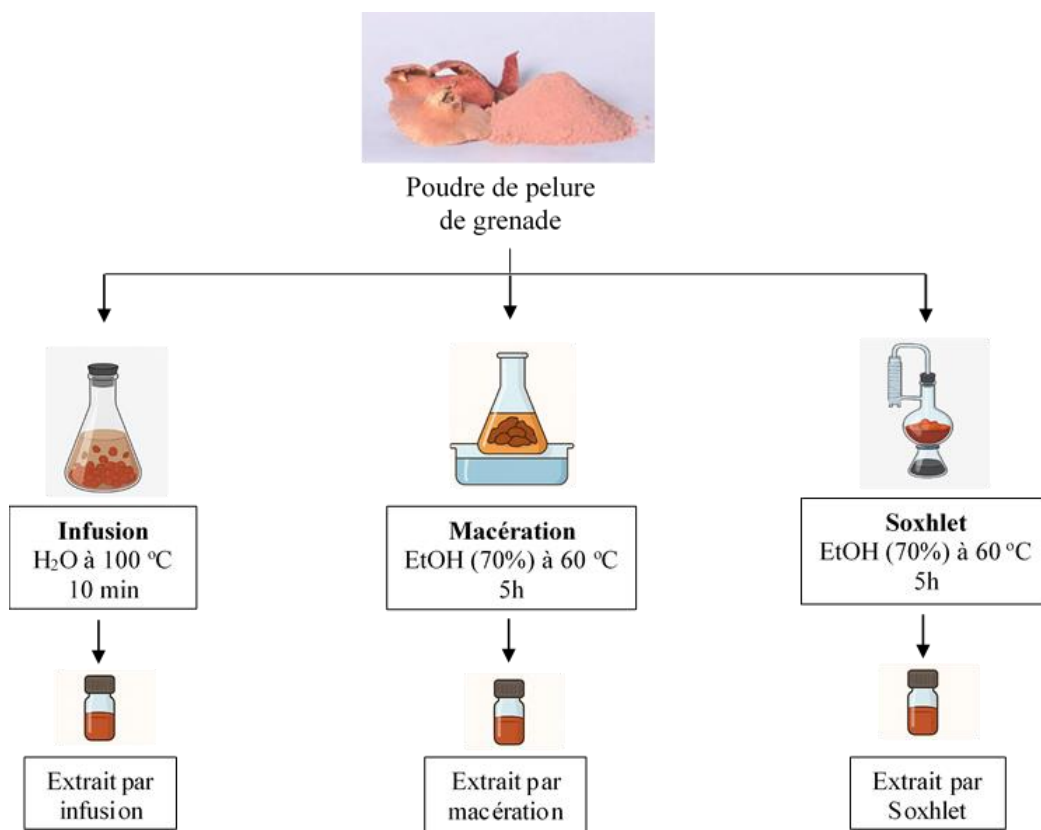


Figure 03 : Schéma des trois méthodes d'extraction par infusion, macération et Soxhlet.

II.2. Dosage des composés phénoliques

II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux (TPC) des extraits a été mesurée par la méthode au réactif Folin-Ciocalteu. Cette technique est basée sur la capacité des groupes hydroxyles phénoliques à réduire le Folin-Ciocalteu, qui produit un complexe de couleur bleu foncé en milieu alcalin (Georgé et al., 2005). Le réactif lui-même est un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3P_4W_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Lorsque les composés phénoliques sont oxydés, le réactif est réduit, ce qui entraîne la formation d'oxydes de bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), responsables de la coloration obtenue (Pérez et al., 2023).

Pour la détermination des TPC, un volume de 500 μl du réactif de Folin-Ciocalteu (1:10) a été ajouté à 100 μl de chaque extrait (0.25 mg/ml). Après incubation de 4 min à température ambiante, 400 μl d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 à 7.5 %) ont été ajoutés. Après agitation au vortex (Neuaction), les tubes ont été incubés au bain-marie (Isotemp®) à $50^{\circ}C$ pendant

10 min. À la fin de l'incubation, une coloration bleue caractéristique est apparue. L'absorbance de chaque échantillon a été mesurée à une longueur d'onde de 760 nm au spectrophotomètre (Biotech Engineering Management CO.LTD. (UK)). Toutes les analyses ont été effectuées en triplicate.

En parallèle, une courbe d'étalonnage a été établie à partir d'une gamme de concentrations croissantes de l'acide gallique (0-150 µg/ml). Ainsi, le TPC a été déterminé à partir de l'équation de régression de cette courbe et les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

II.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium (AlCl_3), telle que décrite par (Rummun et al., 2013). Cette méthode est basée sur la formation de complexes stables entre l' AlCl_3 et certains types de flavonoïdes, notamment les flavones et les flavanols. Le chlorure d'aluminium interagit spécifiquement avec les groupes cétone en position C4 et les groupes hydroxyles présents sur les cycles C, A et/ou B des structures flavonoïques, entraînant ainsi la formation d'un complexe coloré jaune orangé ou légèrement rosée (Lysiuk and Hudz, 2017).

Pour la quantification des flavonoïdes, un volume de 500 µl d'une solution de AlCl_3 (2%) a été ajouté à 500 µl d'extrait à 0.25 mg/ml. Après agitation au vortex, les échantillons ont été incubés à température ambiante pendant 10 minutes. L'absorbance de chaque échantillon a ensuite été mesurée à une longueur d'onde de 430 nm au spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage a été construite en utilisant la quercétine comme standard, avec une gamme de concentrations de 0-50 µg/ml. Toutes les analyses ont été réalisées en triplicate. Le TFC a été déterminée à partir de l'équation de régression de cette courbe, et les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

II.2.3. Dosage des tanins hydrolysables

La teneur en tanins hydrolysables a été déterminée par la méthode colorimétrique à l'iodate de potassium (KIO_3) (Willis, 1998). Cette méthode est basée sur la réaction entre les tanins hydrolysables et le KIO_3 . Une réaction colorimétrique rapide se produit par oxydation des tannins hydrolysables, probablement au niveau de leurs groupes galloyl, d'où l'apparition de ce composé rouge intense (Willis, 1998).

Pour la quantification des tanins hydrolysables, 1250 µl d'une solution de (KIO_3) à 2.5 %, ont été ajoutés à 250 µl de chaque extrait (1 mg/ml). Après agitation au vortex, les mélanges ont

été incubés à 30°C pendant 10 min. L'absorbance de chaque échantillon a ensuite été mesurée à 550 nm au spectrophotomètre. Toutes les analyses ont été réalisées en triplicate.

Une courbe d'étalonnage a été établie à partir de l'acide tannique, avec une gamme de concentrations de 0-1000 µg/ml. La concentration en tanins hydrolysables a été déterminée à partir de l'équation de régression de cette courbe, et les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalents d'acide tannique par gramme d'extrait (mg EAT/g d'extrait).

II.3. Evaluation de l'activité neutralisant le radical cationique, acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS•+)

Le test à l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS) est une méthode largement utilisée pour évaluer la capacité antioxydante d'un extrait végétal ou d'aliments. Son principe est basé sur la neutralisation d'un radical libre coloré, le radical cation ABTS•+, formé par l'oxydation de l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). Ce radical présente une couleur caractéristique bleu-vert avec un pic d'absorbance à 734 nm (Dong *et al.*, 2015).

L'analyse de l'activité antiradicalaire des différents extraits envers le radical cationique ABTS•+ est réalisée selon la méthode décrite par (Re *et al.*, 1999). Une solution stock a été préparée par dissolution de l'ABTS dans de l'eau distillée à une concentration de 7 mM, puis du persulfate de potassium (K₂S₂O₈) a été ajouté à une concentration de 2.45 mM. Ce mélange a été agité pendant 12-16 heures à l'obscurité et à température ambiante. Au moment d'utilisation, cette solution stock a été diluée à l'éthanol pour obtenir une absorbance de 0.07± 0.02 à λ = 734 nm.

Le test a été réalisé en prenant 10 µl de chaque extrait mélangé à 1 ml de la solution diluée de l'ABTS•+. Puis, le mélange a été incubé à 30°C pendant 6 min. Un tube contenant 1 ml de la solution d'ABTS•+ et 10 µl d'éthanol sans extrait, a été utilisé comme contrôle. L'absorbance de tous les échantillons a par la suite été mesurée à λ = 734 nm. Toutes les analyses ont été réalisées en triplicate. La capacité scavenger du radical cationique ABTS•+ a été exprimée en pourcentage (%) selon la formule suivante :

$$AA (\%) = \left[\frac{A_0 - A_t}{A_0} \right] \times 100$$

Où :

AA : Activité antioxydante inhibitrice de l'oxydation du radical ABTS•+.

A0 : Absorbance du contrôle, solution de l'ABTS•+ en absence de l'extrait.

At : Absorbance du test, solution de l'ABTS•+ en présence de l'extrait.

II.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits de pelure de grenade a été évaluée afin de déterminer leur capacité à inhiber la croissance de certaines souches bactériennes pathogènes. Des tests de diffusion en milieu gélosé et en milieu liquide ont été réalisés.

II.4.1. Méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé

Pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits de pelure de grenade, six souches bactériennes de référence (Gram-positif et Gram-négatif) ont été exposées à différentes concentrations d'extraits obtenus par macération, Soxhlet et infusion.

Le test a été réalisé dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller-Hinton (**Annexe I**) selon la méthode de diffusion sur disque (Afonso et al., 2019; Weinstein and Lewis, 2020). Les solutions d'extraits testées ont été préparées dans de l'eau distillée stérile aux concentrations suivantes : 5, 10, 25, 75 et 100 mg/ml. Avant ensemencement, les souches bactériennes ont été revivifiées par repiquage sur gélose nutritive (GN) (**Annexe I**), puis incubées pendant 18-24 h à 37°C. Une suspension bactérienne a ensuite été préparée à partir de colonies fraîches. Son absorbance a été ajustée à 0.08-0.1 à 620 nm, correspondant à une concentration équivalente à 0.5 McFarland (10^8 UFC/ml). Cette suspension a ensuite été ensemencée par écouvillonnage.

Des disques de papier Whatman stériles de 6 mm de diamètre ont été disposés aseptiquement à intervalles réguliers sur la surface de la gélose inoculée, puis imbibés de chaque extrait (10 µl/disque). Trois contrôles différents ont été réalisés ; deux témoins négatifs : de l'éthanol à 70% et de l'eau distillée stérile, et un témoin positif : tétracycline à 1 mg/ml (antibiotique). Après une pré-diffusion de 2 heures au réfrigérateur, les boîtes de Pétri ont été incubées 18-24 h à 37°C. Le diamètre des éventuelles zones d'inhibition ont été mesurés et notés

Tous les tests ont été effectués en triplicate et l'activité antibactérienne a été quantifiée en termes de pourcentage du diamètre relatif de la zone d'inhibition (% RIZD) pour chaque extrait, calculé selon la méthode de (Aires et al., 2009) en utilisant l'équation suivante :

$$\% \text{ RIZD} = \left[\frac{\text{IZD Extrait} - \text{IZD Contrôle } (-)}{\text{IZD Antibiotique}} \right] \times 100$$

Où : IZD est le diamètre de la zone d'inhibition (mm).

II.4.2. Méthode de diffusion en milieu liquide

L'activité antimicrobienne des extraits de pelure de grenade a été également analysée par des tests en milieu liquide sur des microplaques à 96 puits. Cette méthode permet de détecter et quantifier l'effet inhibiteur de l'extrait sur la croissance des microorganismes.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits a été réalisée en triplicate pour chacun des extraits. Chaque puits de la microplaque contenait 150 µl de bouillon nutritif (BN) (**Annexe I**), additionné des différentes concentrations (5, 10, 25, 50, 75 ou 100 mg/ml) des extraits de pelure de grenade plus 50 µl de la suspension bactérienne de 0.5 McFarland. Un contrôle positif de croissance a été inclus, contenant 150 µl de BN et 50 µl de suspension bactérienne sans extrait (Afonso *et al.*, 2019).

Après incubation de 18-24 h à 37°C, l'absorbance a été mesurée à 620 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (BioTek). Le pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne a ensuite été calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{\text{Abs contrôle}(+) - \text{Abs Extrait}}{\text{Abs Contrôle}(+)} \right] \times 100$$

Où :

- Abs contrôle (+) : absorbance de la croissance bactérienne en conditions standards.
- Abs Extrait : absorbance de la croissance bactérienne en présence de l'extrait.

II.4.3. Détermination de l'effet bactéricide/bactériostatique des extraits de pelure de grenade

Un agent bactériostatique empêche les bactéries de se développer sans les tuer immédiatement. En revanche, un agent bactéricide détruit les bactéries en perturbant des fonctions cellulaires essentielles, telles que la synthèse des protéines entraînant leur (Pankey and Sabath, 2004; Németh *et al.*, 2015).

Afin de distinguer l'effet bactéricide de l'effet bactériostatique des extraits de pelure de grenade obtenus par macération, Soxhlet et infusion, une analyse complémentaire a été menée à partir des cultures ayant présenté une inhibition lors des tests en microplaques. Pour cela, 10 µl de ces cultures bactériennes ont été prélevés et déposés en spots et en triplicate sur des boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller-Hinton.

Après incubation à 37°C pendant 24 h, les boîtes ont été observées. L'absence de toute croissance bactérienne au niveau des spots indiquait un effet bactéricide, tandis que la présence de colonies était en faveur d'un effet bactériostatique.

II.5. Evaluation de l'activité antifongique

L'activité antifongique des extraits de pelure de grenade a été testée pour étudier leur capacité à inhiber la croissance ou à tuer certaines souches de champignons. Deux méthodes en milieu solide et liquide ont également été utilisées.

II.5.1. Méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé

Pour évaluer l'activité antifongique des extraits de pelure de grenade, une levure de référence, *Candida albicans* ATCC 1024^T, et trois moisissures, à savoir, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* et *Alternaria sp.*, ont été exposées à différentes concentrations (5, 10, 25, 50, 75 ou 100 mg/ml) des extraits obtenus par macération, Soxhlet et infusion.

L'évaluation de l'activité antifongique des extraits de pelure de grenade a été réalisée selon la méthode de diffusion sur disque dans des boîtes de Pétri contenant du milieu approprié : Mueller-Hinton (**Annexe I**) pour la levure *C. albicans* (Afonso et al., 2019; Weinstein and Lewis, 2020) et Potato Dextrose Agar (PDA) pour les moisissures (Tu et al., 2022). Les solutions d'extraits testées ont été préparées dans de l'eau distillée stérile aux concentrations suivantes : 5, 10, 25, 75 et 100 mg/ml. Avant ensemencement, les souches microbiennes ont été revivifiées par repiquage sur leur milieu (GN pour *C. albicans* et PDA pour les moisissures), puis incubées pendant 18-24 h à 37°C pour la levure et 48-72 h à 25°C pour les moisissures. Une suspension microbienne a ensuite été préparée à partir de colonies fraîches, avec ajustement de l'absorbance à 0.08-0.1 à 620 nm pour *C. albicans* (équivalent à 0.5 McFarland, soit environ 10⁸ UFC/ml) et à 540 nm pour les moisissures. Cette suspension a été ensemencée par écouvillonnage sur des boîtes de Pétri.

Des disques de papier Whatman stériles de 6 mm de diamètre ont été disposés aseptiquement à intervalles réguliers sur la surface de la gélose inoculée, puis imbibés de chaque

extrait (10 µl/disque). Trois contrôles différents ont été réalisés ; deux témoins négatifs : de l'éthanol à 70% et de l'eau distillée stérile, et un témoin positif Amphotéricine B (1 mg/ml) pour *C. albicans* et éconazole (1 mg/ml) pour les moisissures. Après une pré-diffusion de 2 heures au réfrigérateur, les boîtes de Pétri ont été incubées 18-24 h à 37°C pour *C. albicans* et 48-72h à 25°C pour les champignons.

Tous les tests ont été effectués en triplicate et les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés, puis le pourcentage du diamètre relatif de la zone d'inhibition (%RIZD) pour chaque extrait, calculé selon la méthode de (Aires et al., 2009) en appliquant l'équation suivante a été déterminé :

$$\% \text{ RIZD} = \left[\frac{\text{IZD Extrait} - \text{IZD Contrôle (-)}}{\text{IZD Antibiotique}} \right] \times 100$$

Où : IZD est le diamètre de la zone d'inhibition (mm).

II.5.2. Méthode de diffusion en milieu liquide

Un test en milieu liquide sur des microplaques à 96 puits a été également réalisé afin d'analyser l'activité antifongique des différents extraits de la pelure de grenade. Cette méthode permet de déceler et de quantifier l'effet inhibiteur des extraits sur la croissance des microorganismes dans des conditions contrôlées.

L'évaluation de l'activité antifongique des différents extraits de la pelure de grenade a été réalisée en triplicate. Chaque puits de la microplaque contenait 150 µl de BS (**Annexe I**) dans lequel l'extrait de pelure de grenade était dissout aux concentrations testées (5, 10, 25, 50, 75 et 100 mg/ml) plus 50 µl de la suspension fongique (0.08-0.1 à 540 nm). Un contrôle positif de croissance a été inclus, contenant seulement 150 µl de BS et 50 µl de suspension fongique sans l'extrait, selon la méthode adaptée de (Foss et al., 2014). Le blanc (témoin négatif) contenait également 150 µL de BS sans extrait et 50 µl d'eau physiologique stérile sans aucune souche fongique.

Après incubation de 24-48 heures à 25°C, l'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (BioTek). Le pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne a ensuite été calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{\text{Abs contrôle}(+) - \text{Abs Extrait}}{\text{Abs Contrôle}(+)} \right] \times 100$$

Où :

- Abs contrôle (+) : absorbance de la croissance de la souche fongique en conditions standards.
- Abs Extrait : absorbance de la croissance de la souche fongique en présence de l'extrait.

II.5.3. Détermination de l'effet fongicide/fongistatique des extraits de pelure de grenade

Afin de distinguer l'effet fongicide de l'effet fongistatique des extraits de pelure de grenade, une analyse complémentaire a été menée à partir des cultures ayant présenté une inhibition lors des tests en microplaques. Pour cela, 10 µL de ces cultures fongiques ont été prélevés et déposés en spots, en triplicate, sur des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA (moisissures) ou du milieu MH (*C. albicans*).

Après incubation à 25°C pendant 24 à 72h, les boîtes ont été observées à l'œil nu. L'absence de toute croissance fongique au niveau des spots indiquait un effet fongicide, tandis que la présence de croissance représentait un effet fongistatique.

II.6. Analyse statistique

Les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne ± écart type. L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel Graphpad prism 8 en appliquant l'analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test de Tuckey, où une valeur de (p<0.05) a été considérée comme significative.

Cette étude a été réalisée sur des extraits de pelure de grenade obtenus par trois techniques d'extraction différentes ; infusion, macération et Soxhlet. Nous avons évalué l'activité antimicrobienne, envers des souches pathogènes bactériennes et fongiques par des tests de diffusion sur disque en milieu gélosé et de dilution en milieu liquide. Des tests préalables ont été réalisés afin de déterminer les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux et en tanins hydrolysables de chacun des extraits étudiés. L'activité anti-radicalaire a été également analysée par le test à l'ABTS.

I. Rendement de l'extraction

Le rendement d'extraction est un paramètre essentiel en phytotechnologie et en chimie analytique, représentant l'efficacité d'une méthode d'extraction à isoler des composés bioactifs à partir de matrices végétales (Baglary *et al.*, 2024). Il est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec et la masse initiale de matière végétale sèche exprimé en pourcentage (masse d'extrait/100 g de poudre) (Adam *et al.*, 2019).

Tableau I : Rendement des différentes méthodes d'extraction.

Extraits	Rendement (%)
Soxhlet	31.35 ± 2.5^{ns}
Macération	37.08 ± 1.2^{ns}
Infusion	36.57 ± 5.26^{ns}

ns : différence non significative ($p > 0.05$)

Les rendements d'extraction obtenus par infusion, macération et par Soxhlet se situent entre 30 et 37%. Aucune différence significative n'a été révélée entre les trois méthodes utilisées pour la pelure de grenade. Anisi, ces techniques sont comparables et présentent une efficacité similaire en termes de rendement comme l'indiquent les données présentées dans le tableau I.

Le rendement obtenu par macération dans l'éthanol à 70 % dans notre cas est de $37.08 \pm 1.2\%$, un rendement comparable à celui rapporté par (Meziani *et al.*, 2019) de 33.7 % pour un extrait hydro-éthanolique de pelure de grenade de Skikda (Algérie).

Pour l'infusion, le rendement est de $36.57\% \pm 5.26$, un résultat élevé par rapport à celui obtenu par (Sarbaswarup *et al.*, 2019) ; $2.38 \pm 0.04\%$ par infusion et $2.53 \pm 0.012\%$ par macération.

Ces différences pourraient provenir de l'origine botanique de l'échantillon et les conditions d'extraction (Zahin et al., 2010). En effet, le rendement d'une extraction est influencé par plusieurs facteurs, tels que la méthode d'extraction (Infusion, Soxhlet...), le solvant employé (Ethanol, Méthanol...), la polarité des composés ciblés, ainsi que les conditions opératoires (température, temps, agitation, etc.) (Michel et al., 2012; Rodríguez-Moreno and Legaz, 2025) .

L'extraction des composés bioactifs à partir de matrices végétales peut être optimisée par l'utilisation de solvants hydro-organiques, tels que l'éthanol (70 %). Ce mélange permet d'extraire efficacement une variété de composé tels que les polyphénols et flavonoïdes, ce qui améliore le rendement global de l'extraction (Li et al., 2007; Mphahlele et al., 2016) . De plus, l'emploi de tels mélanges facilite la séparation et la purification des substances extraites tout en réduisant les pertes liées à la dégradation de solvant (Do et al., 2014). Par ailleurs, une élévation de la température entre 40 et 60 °C a par exemple été associée à une augmentation du rendement de 24 % à 30 % (Michel et al., 2012), probablement en raison de l'augmentation de la solubilité des solutés dans le solvant. Toutefois, cette élévation doit être contrôlée pour éviter toute dégradation thermique des composés sensibles.

II. Dosage des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ils jouent un rôle essentiel dans la défense des plantes contre les agressions extérieures et contribuent aux propriétés organoleptiques telles que la couleur, l'amertume et l'astringence des aliments (ghalem and Bnali, 2021; Saini et al., 2024) . Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux et en tanins hydrolysables contenus dans les trois extraits de pelure de grenade ont été estimés par différentes méthodes de dosage colorimétrique.

1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode spectrométrique utilisant le réactif du Folin-Ciocalteu. Les teneurs en polyphénols ont été calculées selon la gamme étalon à l'acide gallique (**Figure 03**). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II.

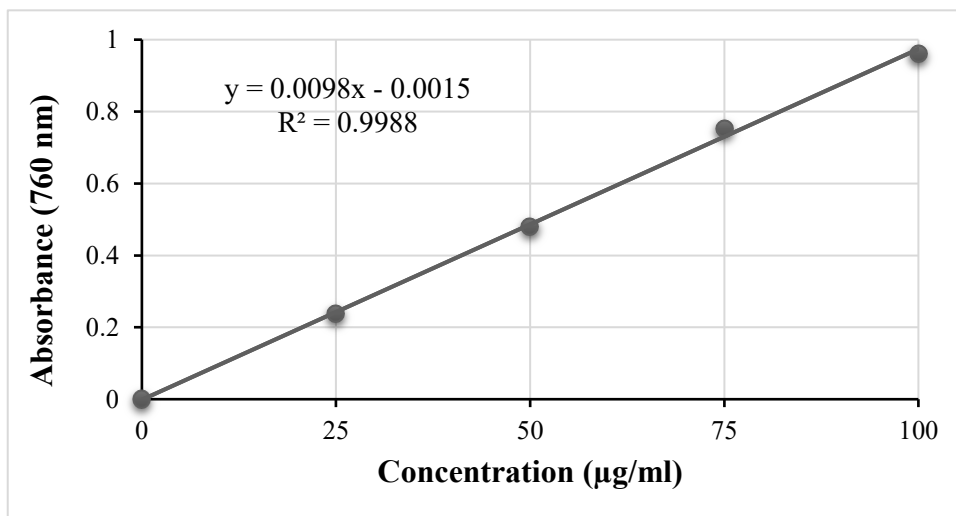


Figure 03 : Courbe d'étalonnage à l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Tableau II : Contenu en polyphénols totaux d'extraits de pelure de grenade obtenus par différentes méthodes d'extraction.

Extraits	Contenu en polyphénols (mg EAG/g d'extrait sec)
Soxhlet	242.60 ± 14.92 ^{ns}
Macération	258.88 ± 35.52 ^{ns}
Infusion	250.61 ± 38.31 ^{ns}

ns : différence non significative ($p > 0.05$)

Dans notre étude, les extraits de pelure de grenade ont révélé des teneurs élevées en polyphénols totaux (TPC) pour les trois extraits testés. L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative entre ces extraits ($p > 0.05$), suggérant que les trois méthodes sont comparables en termes d'efficacité pour l'extraction des polyphénols.

Ces valeurs sont cohérentes avec celles rapportées par des études antérieures qui ont montré des valeurs différentes en polyphénols totaux. Des teneurs allant jusqu'à 270 mg EAG/g dans des extraits de pelure de grenade ont été obtenus par extraction hydro-alcoolique (Mphahlele et al., 2016). Dans une autre étude, l'extraction par macération à l'éthanol à 70% a permis d'extraire plus de 250 mg EAG/g, confirmant l'efficacité de cette technique (Qu et al., 2010). En revanche, des

teneurs inférieures en polyphénols (~180 mg EAG/g) ont été obtenues par infusion (Sarbaswarup et al., 2019), ce qui démontre l'influence majeure du type de solvant utilisé.

L'utilisation de solvants hydro-organiques, tels que l'éthanol 70 %, constitue une stratégie largement adoptée pour l'extraction des métabolites secondaires, notamment les composés phénoliques, en raison de sa capacité à extraire efficacement des substances à polarité variable (Bourgou et al., 2016). Les variations de teneur en composés phénoliques ne dépendent pas uniquement de la méthode ou du solvant d'extraction, mais aussi d'autres facteurs tels que l'origine botanique et la variété du fruit, les conditions climatiques, et le degré de maturité au moment de la récolte (Elfalleh et al., 2011; Drevelegka and Goula, 2020). Ces paramètres influencent fortement la composition chimique finale de l'extrait.

2. Dosage des flavonoïdes totaux

La figure 04 présente la gamme étalon à la quercétine utilisée pour la quantification des flavonoïdes totaux contenus dans les extraits préparés à partir des pelures de grenade. Les résultats du dosage des flavonoïdes totaux pour les différents extraits (infusion, macération et Soxhlet) sont illustrés dans le tableau III.

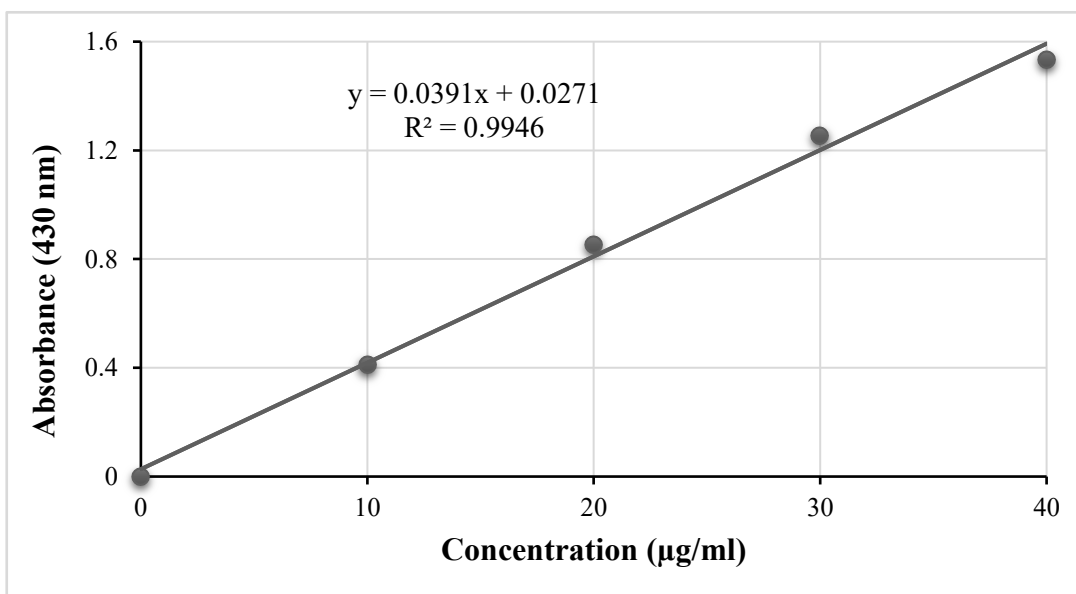


Figure 04 : Courbe d'étalonnage à la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

Les teneurs en flavonoïdes totaux (TFC) obtenues à partir des pelures de grenade ont révélé des contenus comparables entre macération (25.79 ± 5.50 mg EQ/g d'extrait sec), Soxhlet (25.22 ± 3.95 mg EQ/g) et infusion (22.48 ± 3.90 mg EQ/g). Aucune différence significative n'a été trouvée entre les trois extraits ($p > 0.05$).

Tableau III : Contenu en flavonoïdes totaux d'extraits de pelure de grenades obtenus par différentes méthodes d'extraction.

Extraits	Contenu en flavonoïdes (mg EQ/g d'extrait sec)
Soxhlet	25.22 ± 3.95^{ns}
Macération	25.79 ± 5.50^{ns}
Infusion	22.48 ± 3.90^{ns}

ns : différence non significative ($p > 0.05$)

Ces résultats corroborent ceux rapportés par (Meziani et al., 2019), qui ont retrouvé des teneurs similaires entre macération et infusion. D'autres travaux ont révélé des valeurs plus élevées, comme (El-Beltagi et al., 2024) qui ont obtenu 45.3 ± 0.5 mg EQ/g par macération aqueuse à 37°C pendant 24 h, et Ranjha *et al.* (2024), qui ont rapporté 27.61 mg EQ/g en utilisant du méthanol à 75 % à 40°C pendant 20 h. Ces différences peuvent être attribuées à plusieurs facteurs dont le type de solvant, la température, la durée d'extraction et les caractéristiques intrinsèques de la matière végétale (Ranjha et al., 2020; El-Beltagi et al., 2024).

Sur le plan méthodologique, la quantification des flavonoïdes totaux est basée sur la formation de complexes avec du trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Cette méthode peut sous-estimer la teneur réelle en flavonoïdes si certains composés de l'extrait ne réagissent pas avec le réactif colorimétrique utilisé (Meziani et al., 2019). Enfin, de nouvelles approches telles que l'extraction assistée par ultrasons utilisant des solvants eutectiques profonds (Lu et al., 2024), ou l'extraction assistée par micro-ondes (Grillo et al., 2023) offrant des alternatives prometteuses pour améliorer la récupération des flavonoïdes.

3. Dosage des tanins hydrolysables

Le dosage des tanins hydrolysables contenus des extraits de pelure de grenade a été réalisé par la méthode colorimétrique utilisant l'iodate de potassium (KIO_3). Les résultats obtenus de la

gamme étalon à l'acide tannique sont illustrés en figure 05. Le tableau IV, présente les résultats du dosage des tanins hydrolysables.

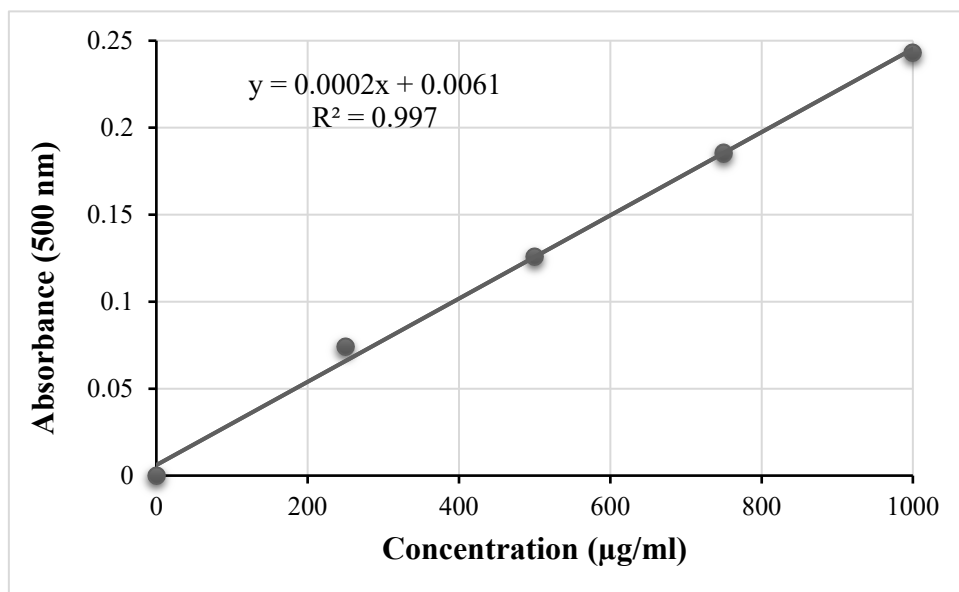


Figure 05 : Courbe d'étalonnage à l'acide tannique pour le dosage des tanins hydrolysables.

Tableau IV : Contenu en tanins hydrolysables des extraits de pelure de grenade obtenus par différentes méthodes d'extraction.

Extraits	Contenu en tanins hydrolysables (mg EAT/g d'extrait sec)
Soxhlet	12.05± 0.86 ^{ns}
Macération	11.50 ±2.01 ^{ns}
Infusion	8.71 ± 0.40 ^{ns}

ns : différence non significative ($p > 0.05$)

Les teneurs en tanins hydrolysables (TH) des extraits de pelures de grenade varient selon la méthode d'extraction utilisée (8-12 mg EAT/g extrait sec). L'analyse statistique n'a montré aucune différence significative entre les trois extraits ($p > 0.05$).

Ces résultats sont en accord avec les données rapportées (Elkahoui et al., 2024), qui ont trouvé une valeur de 11.5 mg TAE/g dans l'extrait méthanolique. Cependant, des valeurs nettement plus importantes ont été montrées par (Çam and Hışıl, 2010), où une teneur de 262.7 mg

EAT/g par extraction pressurisée à l'eau. De plus, (Sweidan et al., 2023) ont rapporté des teneurs significativement plus élevées en tanins hydrolysables avec extrait éthanolique (688.50 ± 3.54 mg EAT/g.).

Ces variabilités seraient dues au type de solvant utilisé, la température, la pression, et le temps d'extraction appliqués ainsi que le ratio solide/liquide. Les méthodes douces comme l'infusion ou la macération aqueuse à température ambiante, bien que plus simples et écologiques, restent moins efficaces pour extraire les tanins hydrolysables que les techniques assistées ou les solvants organiques (Pinelo et al., 2005; Xuan Cuong et al., 2020). De plus, (Yan et al., 2017) ont démontré que l'optimisation des paramètres d'extraction (température, temps, ratio solide/liquide) permet d'accroître significativement la récupération des tanins. Ces observations confirment que le choix de la méthode d'extraction est déterminant pour optimiser le rendement en tanins hydrolysables.

III. Effet neutralisant le radical cationique 2,2'-azino-bis (3éthylbenzo thiazoline-6 sulphonique (ABTS⁺•))

Le test à l'ABTS permet d'évaluer l'activité antioxydante d'un extrait en mesurant sa capacité à neutraliser le radical ABTS⁺•, identifiable par sa couleur bleu-vert. L'ajout de l'extrait entraîne une décoloration, proportionnelle à son pouvoir antioxydant, en pourcentage d'inhibition de l'oxydation du radical (**Figure 06**). Une analyse statistique a été réalisée afin de déterminer les différences significatives d'activité antioxydante entre les différents extraits à une même concentration (**Figure 06.A**), ainsi qu'entre les concentrations au sein d'un même extrait (**Figure 06.B**).

Les résultats obtenus indiquent qu'à une même concentration aucune différence significative n'a été observée entre les trois extraits étudiés, suggérant une efficacité comparable dans ces conditions. Par ailleurs, l'analyse entre différentes concentrations (0.25, 0.5 et 1 mg/ml) d'un même extrait, a révélé une différence significative entre 0.25 et 0.5 mg/ml, ainsi qu'entre 0.25 et 1 mg/ml ($p < 0.05$). Cependant, aucune différence significative n'a été relevée entre 0.5 et 1 mg/ml, ce qui suggère qu'une activité antioxydante maximale (80-90%) est atteinte 0.5 mg/ml.

Ces résultats sont en accord avec d'autres études, qui ont évalué un extrait aqueux de pelure de grenade obtenu par macération, et ont rapporté un taux de 79.12 % d'inhibition de l'oxydation de l'ABTS à 1 mg/ml. Cette valeur est inférieure à celle observée dans notre étude pour l'infusion

(91.25 %), ce qui pourrait s'expliquer par une différence des conditions liées au protocole d'extraction (Segar et al., 2023). Par ailleurs, une autre étude a rapporté une activité antioxydante de $72.07 \% \pm 0.02$ pour un extrait éthanolique de pelure de grenade envers le radical ABTS, mettant en évidence l'efficacité de ce solvant pour l'extraction des composés bioactifs antioxydants (Abdealsiede et al., 2020).

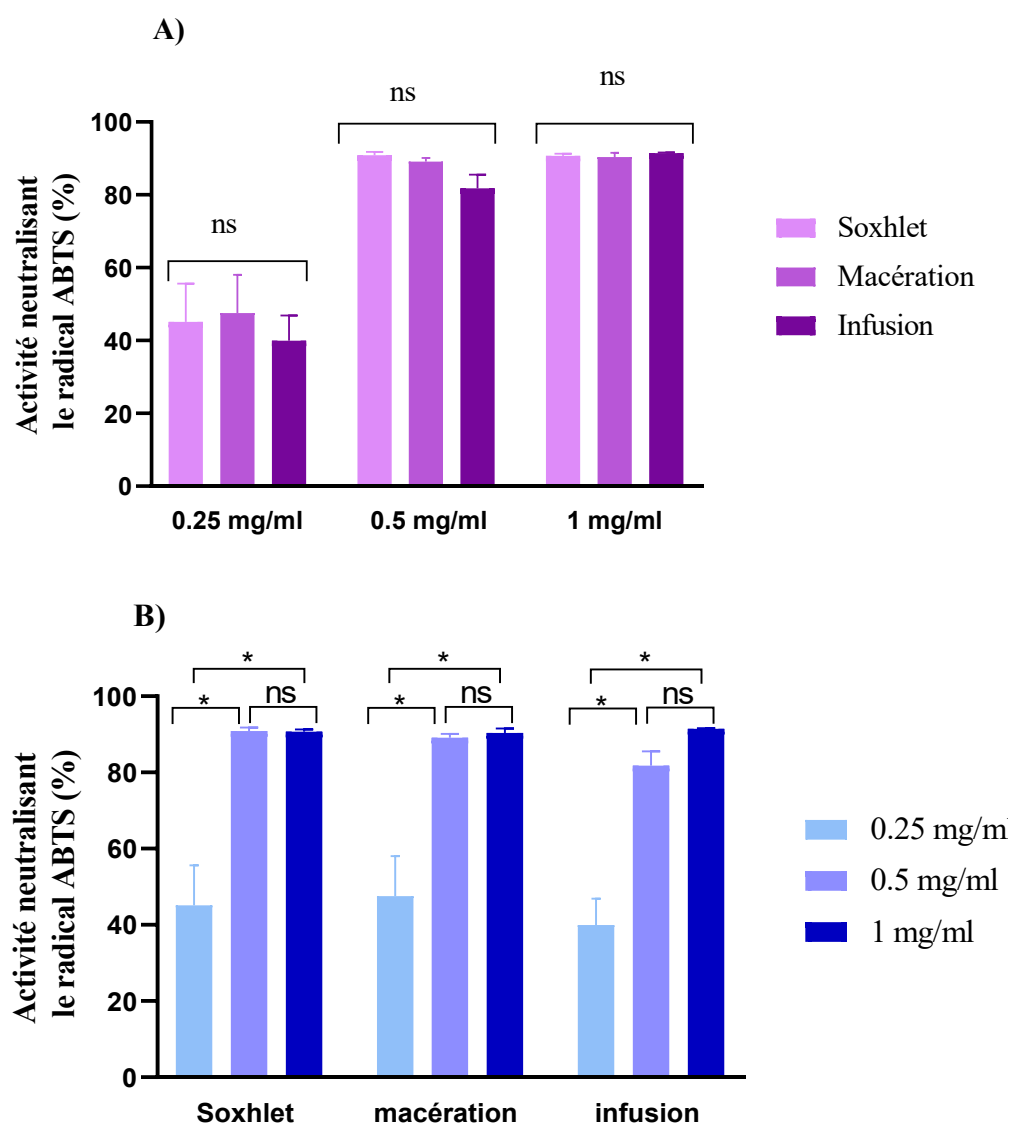


Figure 06 : Activité neutralisant le radical ABTS+• par les différents extraits de la pelure de grenade. A) Comparaison entre les différents extraits. B) Comparaison entre les différentes concentrations.

IV. Evaluation de l'activité antibactérienne

Les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de pelure de grenade, présentés ci-après, permettent de comparer l'efficacité des différentes méthodes d'extraction en fonction des concentrations testées, grâce aux tests réalisés en milieux solide (diffusion sur disque) et liquide (microplaques à 96 puits).

IV.1. Méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé

L'analyse des résultats de l'activité antibactérienne des extraits de pelure de grenade obtenus par Soxhlet, macération et infusion, testés par la méthode de diffusion sur disque, montre une efficacité variable selon la souche bactérienne, la concentration de l'extrait et la méthode d'extraction (Tableau V).

Comme le montre le tableau V, aucune zone d'inhibition n'a été observée pour *B. cereus*, *E. coli* et *S. typhimurium*, ce qui indique probablement une résistance de ces bactéries à l'ensemble des extraits testés (**Figure 08.a**). À l'inverse, les différents extraits ont montré une activité inhibitrice similaire et croissante (28.32-49.21%) à partir de 25 mg/ml sur *B. subtilis*. Quant à *S. aureus* ATCC 6314^T, elle a présenté une sensibilité progressive dès 10 mg/ml d'extrait, avec une activité comparable entre les trois extraits (**Figure 08.b**).

La réponse la plus marquée a été observée sur *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031^T, qui s'est révélée sensible dès la plus faible concentration testée, à savoir, 5 mg/ml. L'extrait obtenu par infusion a conduit à une inhibition maximale ($99.63 \pm 2.60\%$), surpassant les extraits obtenus par Soxhlet et macération. Ce résultat serait dû à une meilleure disponibilité des composés hydrosolubles, notamment les tanins hydrolysables et certains acides phénoliques, extraits dans des conditions favorisant leur diffusion rapide dans l'eau chaude (Sarbaswarup et al., 2019). L'extrait par macération et par Soxhlet se sont révélés efficaces à concentrations élevées (>50 mg/ml), particulièrement contre *B. subtilis* (40-45%) et *K. pneumoniae* (50-75%).

Tableau V : Pourcentages des diamètres relatifs des zones d'inhibition (% RIZD) des extraits de pelure de grenade contre les souches bactériennes testées.

Extrait (mg/ml)		Souches bactériennes (% RIZD)					
		<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhimurium</i>
Soxhlet	5		-	-		4.10 ± 4.06	
	10		-	1.92 ± 4.45		31.57 ± 7.94	
	25	R	28.64 ± 2.05	11.86 ± 5.24	R	41.41 ± 5.80	R
	50		40.28 ± 3.23	20.84 ± 5.88		47.77 ± 2.03	
	75		43.83 ± 1.59	24.69 ± 2.72		59.86 ± 2.90	
	100		46.30 ± 2.71	26.61 ± 0.90		75.17 ± 1.18	
Macération	5		-	-		7.99 ± 7.83	
	10		-	6.41 ± 1.81		41.00 ± 2.90	
	25	R	29.72 ± 2.87	6.57 ± 1.58	R	46.74 ± 6.1	R
	50		40.49 ± 2.33	19.88 ± 2.04		55.49 ± 2.03	
	75		45.66 ± 4.11	26.77 ± 2.04		64.37 ± 4.32	
	100		49.21 ± 0.81	28.70 ± 2.95		76.53 ± 1.45	
Infusion	5		-	-		47.56 ± 5.21	
	10		-	2.72 ± 0.23		73.12 ± 0.87	
	25	R	28.32 ± 1.49	9.19 ± 4.45	R	85.56 ± 5.80	R
	50		37.26 ± 1.89	16.03 ± 5.13		86.79 ± 2.32	
	75		39.25 ± 1.59	20.41 ± 4.42		96.35 ± 2.17	
	100		45.66 ± 4.71	30.62 ± 0.68		99.63 ± 2.60	

E. coli : ATCC 25922^T ; *K. pneumoniae* : ATCC 10031^T ; *S. typhimurium* : ATCC 14028^T ; *S. aureus* : ATCC 6314^T ; *B. subtilis* : ATCC 6633^T ; *B. cereus* : ATCC 10876^T ; **R** : Résistante (Aucune zone d'inhibition).

Ces résultats mettent en évidence une variabilité inter-souches importante. En effet, les Gram positif comme *B. subtilis* et *S. aureus* étant globalement plus sensibles, tandis que les Gram négatif présentent une résistance plus importante, à l'exception de *K. pneumoniae*. Cette différence peut s'expliquer par la structure de la paroi cellulaire, où les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe lipopolysaccharidique qui agit comme une barrière empêchant la pénétration

des composés bioactifs. Par contre, les bactéries à Gram positif, n'ayant pas cette membrane externe, présentent une paroi plus perméable, facilitant l'accès des agents antimicrobiens aux cibles intracellulaires (Nikaido, 2003; Sugawara et al., 2016).

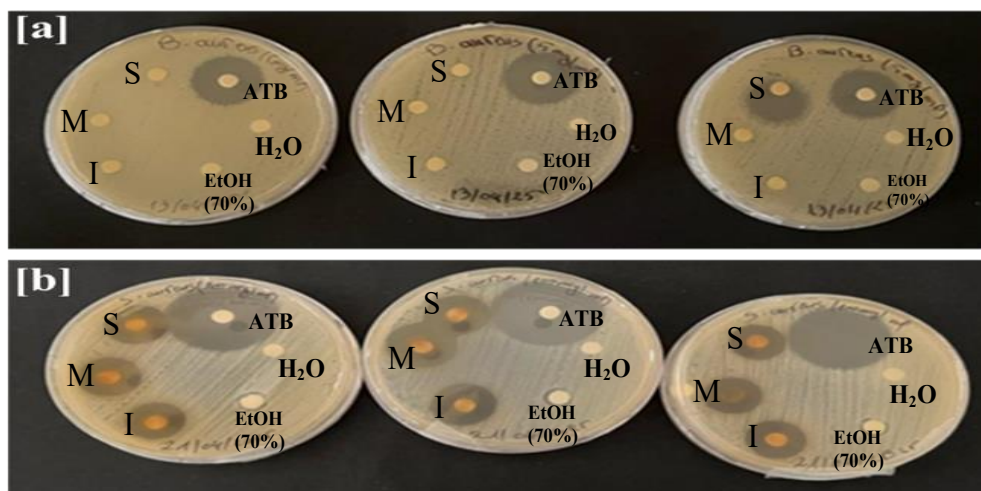


Figure 08 : Zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les différents extraits de la pelure de grenade. (M : Macération ; S: Soxhlet ; I: Infusion ; ATB : Antibiotique ; EtOH (70%) : éthanol 70%).

Des études antérieures ayant évalué l'activité antibactérienne de la pelure de grenade confirment globalement nos observations et permettent de situer nos résultats dans un contexte plus large. Une étude de (Scaglione et al., 2024) a montré que des extraits hydroalcooliques de pelure de grenade testés par diffusion sur disque exerçaient une inhibition significative contre *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* et *S. typhimurium*, avec une réponse dose-dépendante similaire à celle observée dans notre travail. De même, (Debib et al., 2022) ont montré que les extraits alcooliques de pelure de grenade présentaient une activité antibactérienne modérée à forte contre *K. pneumoniae*, *E. coli* et *S. aureus*, avec des zones d'inhibition entre 11 ± 0.9 mm et 29 ± 1.12 mm, selon les souches testées. (Siddiqui et al., 2024) ont étudié l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique (0.5-2 mg/ml) de pelure de grenade contre *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* et *Enterococcus faecalis*. L'extrait a montré une inhibition avec une zone comprise entre 16 et 25 mm pour toutes les souches bactériennes testées. L'inhibition la plus élevée ayant été observée pour *Micrococcus*

luteus (25 mm). (Balaban et al., 2021) ont également mis en évidence une activité antibactérienne des extraits d'acide méthanol non dilués de pelure de grenade contre *B. subtilis* et *B. cereus*.

Les valeurs de zones d'inhibitions (34-36 mm), étaient en rapport avec la richesse de pelure de grenade en tanins, notamment la punicalagine qui endommage la membrane cytoplasmique, provoque la dépolarisation membranaire et la fuite des ions intracellulaires, des protéines et des acides nucléiques. La punicalagine induit une diminution importante des niveaux intracellulaires d'ATP traduisant une perturbation du métabolisme énergétique (Liu et al., 2024).

V.2. Méthode de diffusion en milieu liquide

Les résultats de l'analyse antibactérienne en milieu liquide des extraits de pelure de grenade, sont présentés dans le tableau I (**Annexe II**). Ces extraits obtenus par Soxhlet, macération et infusion ont présenté une activité antibactérienne marquée lorsqu'ils sont testés par la méthode de diffusion en milieu liquide.

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches de référence testées sont sensibles aux extraits de pelure de grenade quelle que soit la méthode d'extraction utilisée avec des pourcentages d'inhibition allant de 29 à 97.5% (**Figure 09**). Pour *Escherichia coli* ATCC 25922^T, les taux d'inhibition ont atteint 85% dès 10 mg/ml d'extrait par macération et infusion, tandis que l'extrait Soxhlet dépasse 95% à 100 mg/ml, montrant une efficacité croissante dose-dépendante. De plus, *K. pneumoniae* a montré une sensibilité marquée envers l'extrait par infusion par rapport aux deux autres méthodes. Cependant, *S. typhimurium* a été plus sensible à l'extrait Soxhlet avec une inhibition de 95.74 % à 100 mg/ml, et 86–89 % à la même concentration pour les extraits par macération ou infusion. Ces résultats suggèrent que les composés thermostables comme la punicalagine sont mieux extraits à chaud. En effet, la punicalagine, principal composé polyphénolique de la pelure de grenade, est un ellagitannin thermostable largement responsable de l'activité antibactérienne observée (Fischer et al., 2011). Ces composés sont mieux extraits à températures élevées, ce qui facilite la libération de leurs nombreux groupes hydroxyles (Mashile et al., 2024).

Par ailleurs, pour *S. aureus*, les trois extraits ont montré une inhibition élevée (>92 %) dès 50 mg/ml d'extrait. Enfin, *B. cereus* et *B. subtilis* se sont révélés les plus sensibles, où des

inhibitions supérieures à 90 % ont été observées à partir de 25–50 mg/ml pour presque tous les extraits, avec 97 % d’inhibition de croissance de *B. subtilis* par l’extrait Soxhlet.

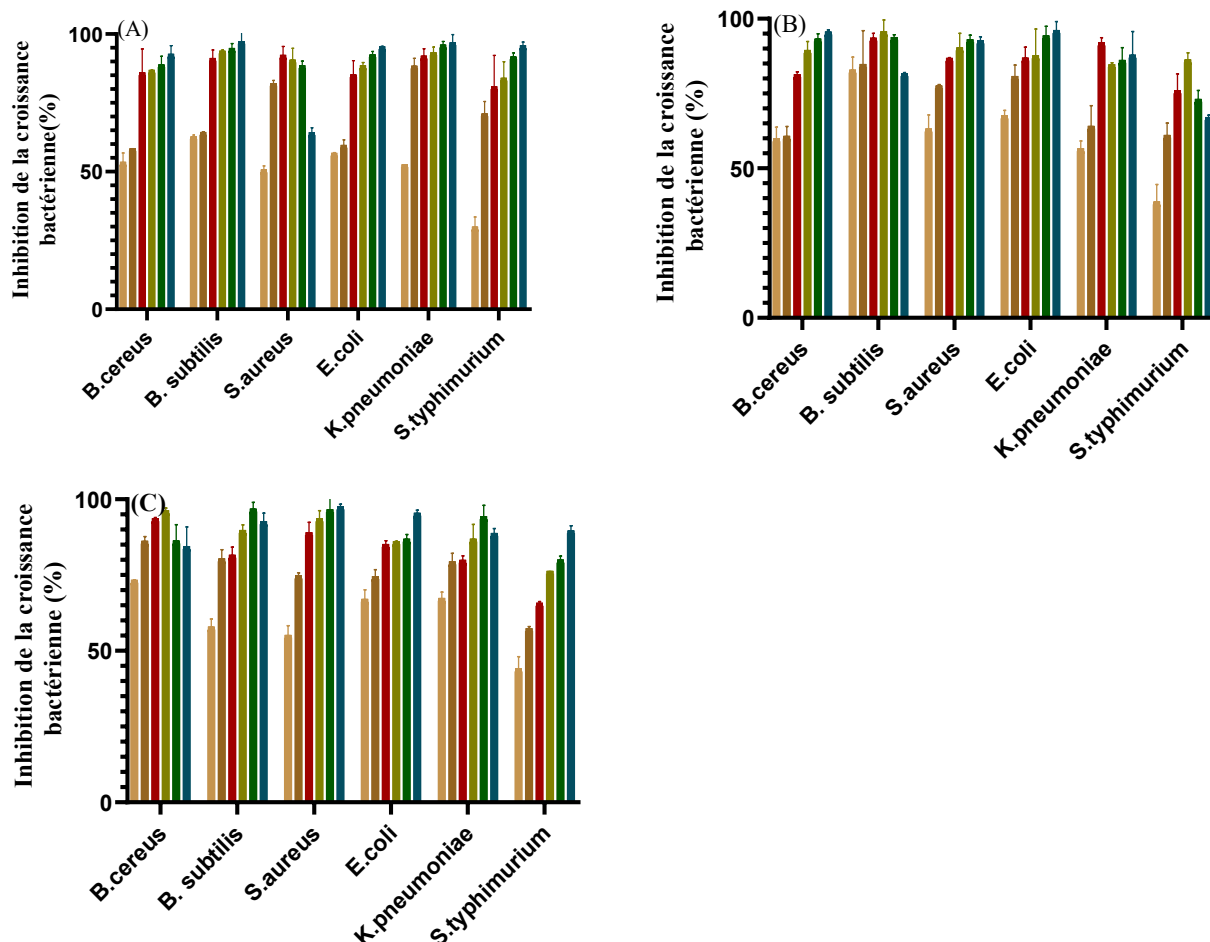


Figure 09 : Pourcentages d’inhibition de la croissance de diverses souches bactériennes par les différents extraits de la pelure de grenade. A) Soxhlet, B) Macération, C) Infusion.

En comparant les souches entre elles, *B. subtilis* et *B. cereus* ressortent comme les plus sensibles. Ceci est probablement dû à la structure de leur paroi typique des Gram positif, plus perméable aux composés phénoliques. Les trois extraits ont induit une réponse antibactérienne significative chez *S. aureus* ($97.45 \pm 0.67\%$ à 100 mg/ml, infusion). Les entérobactéries comme *E. coli*, *K. pneumoniae*, et *S. typhimurium* ont également montré une sensibilité, mais avec une

variabilité plus marquée selon la nature de l'extrait, *S. typhimurium* étant clairement plus sensible à l'extrait Soxhlet ($95.74 \pm 1.36\%$ à 100 mg/ml).

Il a été récemment rapporté une forte inhibition d'*E. coli*, *S. aureus* et *S. typhimurium* par des extraits éthanoliques de pelure de grenade obtenus à chaud, ce qui serait attribuable aux tanins hydrolysables (Wu et al., 2025), notamment les punicalagines. En effet, ces composés sont mieux extraits à des températures élevées. Leurs groupes hydroxyles interagissent fortement avec les membranes bactériennes provoquant des altérations structurelles telles que la déstabilisation de la membrane cytoplasmique (Mashile et al., 2024).

Par ailleurs, (Abdulaziz Alqahtani et al., 2023) ont confirmé l'efficacité de l'extrait de pelure de grenade par Soxhlet contre *S. aureus* avec des zones d'inhibition de 12.6 ± 0.5 mm (MBC=10 µg/ml). Dans une autre étude, (Malviya et al., 2014) a également montré que des extraits de pelure de grenade inhibaient fortement la croissance de *S. aureus* (24.5 mm), *Salmonella typhi* (28.0 mm), et une activité plus faible contre *K. pneumoniae* (14.3 mm). En ce qui concerne les souches bacillaires, (Balaban et al., 2021) ont observé des zones d'inhibition atteignant 34 à 36 mm avec des extraits hydroalcooliques de la pelure de grenade, ce qui indique une forte sensibilité de *B. subtilis*. Ces observations sont en accord avec nos résultats en milieu liquide, où des pourcentages d'inhibition supérieurs à 95 % ont été observés à partir de 50 mg/ml, notamment par l'extrait d'infusion.

L'ensemble de ces résultats souligne l'importance des composés phénoliques majeurs présents dans la pelure de grenade, tels que la punicalagine et l'acide ellagique, dans l'activité antibactérienne. Ces composés agiraient par plusieurs mécanismes dont la déstabilisation de la membrane bactérienne et fuite des constituants intracellulaires, inhibition d'enzymes impliquées dans la synthèse cellulaire comme l'ATPase induisant une baisse des niveaux intracellulaires d'ATP, et l'inhibition possible de l'ATP synthase ainsi que la génération d'un stress oxydant intracellulaire (Liu et al., 2024; Wu et al., 2025). Ce dernier mécanisme rejoint nos résultats du test à l'ABTS qui ont révélé une activité antioxydante marquée des extraits, atteignant 91.25 % pour l'infusion (1 mg/ml) et 77.23 % pour l'extrait Soxhlet (0.5 mg/ml). Ces valeurs traduisent la capacité des extraits, riches en composés phénoliques, à moduler l'équilibre redox bactérien et de contribuer à l'induction du stress oxydant dans les cellules (Abdealsiede et al., 2020; Segar et al., 2023).

IV.3. Détermination de l'effet bactéricide/ bactériostatique des extraits de pelure de grenade

Les résultats de l'évaluation de l'effet bactéricide ou bactériostatique a révélé que l'effet des extraits de pelure de grenade varie selon la souche bactérienne, la concentration de l'extrait et la méthode d'extraction. En effet, un effet bactériostatique a été observé lorsqu'il y a reprise de la croissance bactérienne, tandis qu'un effet bactéricide a été confirmé par l'absence totale de croissance bactérienne sur gélose (**Figure 10**).

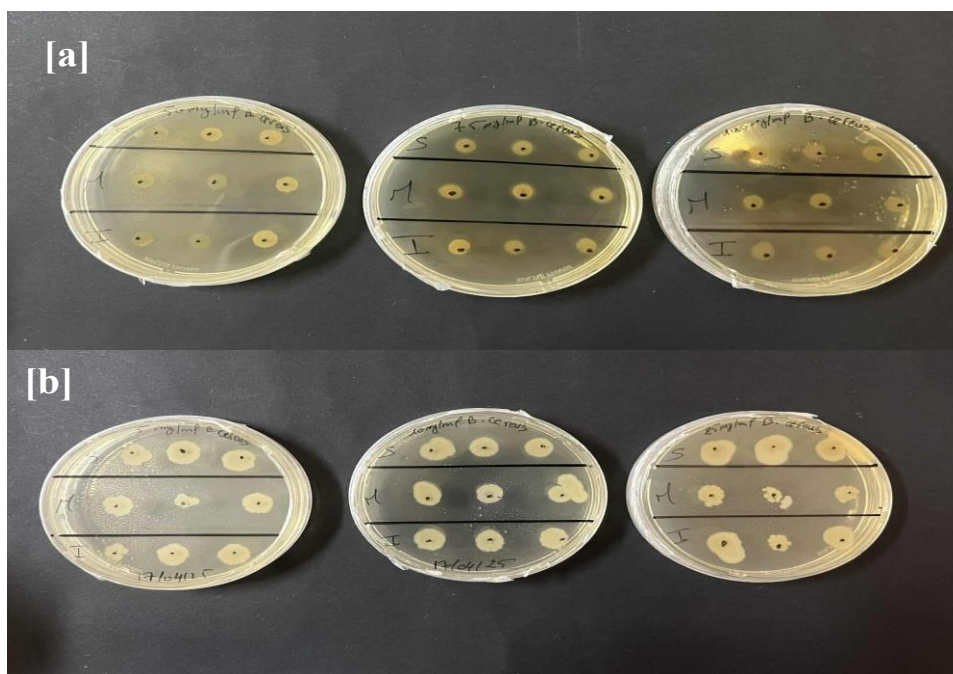


Figure 10 : Résultats de l'analyse de l'effet bactéricide/bactériostatique des extraits de la pelure de grenade sur la croissance bactérienne.

Pour *S. aureus*, l'extrait Soxhlet est bactériostatique à 5 mg/ml, mais devient bactéricide dès 10 mg/ml. En revanche, les extraits obtenus par macération et infusion ont eu un effet bactéricide à toutes les concentrations testées, ce qui montre leur forte efficacité. Pour *K. pneumoniae*, tous les extraits (Soxhlet, macération et infusion) ont été bactéricides à toutes les concentrations. Quant à *S. typhimurium*, les trois extraits ont été bactériostatiques à faibles concentrations (5, 10 et 25 mg/ml). Cependant, les extraits se sont montrés bactéricides à partir de 50 mg/ml. Pour *E. coli*, les extraits Soxhlet et macération sont bactéricides à partir de 25 mg/ml, alors que l'infusion l'est à partir de 50 mg/ml. À 5 et 10 mg/ml, un effet bactériostatique a été

observé ce qui indique que *E. coli* est sensible aux extraits de pelure de grenade, même à faible concentration. *B. cereus* apparaît plus résistante, où l'extrait Soxhlet devient bactéricide seulement à partir de 75 mg/ml, tandis que la macération et l'infusion ont montré un effet bactéricide dès 50 mg/ml. Enfin, *B. subtilis* a présenté un effet bactériostatique à 5 et 10 mg/ml, mais est devenu bactéricide à partir de 25 jusqu'à 100 mg/ml pour les trois extraits.

Ces résultats sont en accord avec plusieurs études antérieures qui confirment l'effet bactéricide des extraits de pelure de grenade envers différentes souches pathogènes. (Wu et al., 2025) ont montré que des extraits éthanoliques préparés par Soxhlet entraînaient une inhibition de *Salmonella enterica* et *E. coli*, indiquant un effet bactéricide dépendant de la concentration. De même, (Abdulaziz Alqahtani et al., 2023) ont rapporté une activité bactéricide marquée de l'extrait Soxhlet contre *S. aureus* avec une concentration minimale bactéricidie (MBC) de 10 mg/ml, confirmant qu'à cette concentration, les cellules sont toutes éliminées. Des résultats de (hussein et al., 2019; Liu et al., 2024) ont rapporté une activité antibactérienne importante des extraits éthanoliques de pelure de grenade contre *K. pneumoniae* où la zone d'inhibition maximale était de 28 mm à 200 mg/ml, avec une activité observable dès 3 mg/ml, indiquant son efficacité à faible concentration.

L'ensemble de ces résultats confirme la large efficacité antimicrobienne des composés bioactifs de la pelure de grenade (tanins hydrolysables), reconnus pour induire une déstabilisation des membranes bactériennes, précipiter les protéines membranaires et perturber l'intégrité de l'enveloppe et l'induction d'une diminution de l'ATP intracellulaire (Liu et al., 2024).

V. Evaluation de l'activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique des extraits de pelure de grenade a permis d'obtenir les résultats présentés ci-dessous par les tests réalisés en milieux solide (diffusion sur disque) et liquide (microplaques à 96 puits).

V.1. Méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé

L'analyse de l'activité antifongique des extraits de pelure de grenade obtenus par Soxhlet, macération et infusion, testés par la méthode de diffusion sur gélose a révélé une efficacité limitée (**Tableau VI**).

Tableau VI : Pourcentages des diamètres relatifs des zones d'inhibition (% RIZD) de la croissance des souches fongiques par les différents extraits de pelure de grenade.

Extrait (mg/ml)		Souches fongiques (% RIZD)			
		<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
Soxhlet	5	-	R	R	R
	10	-			
	25	-			
	50	65.91 ± 2.96			
	75	63.14 ± 1.23			
	100	71.28 ± 3.05			
Macération	5	-	R	R	R
	10	-			
	25	-			
	50	64.77 ± 2.42			
	75	67.05 ± 2.41			
	100	69.65 ± 1.41			
Infusion	5	-	R	R	R
	10	-			
	25	-			
	50	53.70 ± 2.07			
	75	60.37 ± 1.72			
	100	60.54 ± 0.69			

Candida albicans: ATCC 1024^T; *Aspergillus niger*; *Penicillium* sp; *Alternaria* sp.

Les moisissures filamenteuses *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. et *Alternaria* sp. se sont montrées totalement résistantes à l'ensemble des extraits testés à différentes concentrations (**Figure 11.a**). Cette résistance pourrait s'expliquer par la structure particulière de leur paroi cellulaire, épaisse et rigide, riche en β -glucanes, en chitine et en glycoprotéines, qui joue un rôle de barrière physique empêchant la pénétration des composés bioactifs (Free, 2013; Gow et al., 2017)

En revanche, *Candida albicans* ATCC 1024^T a présenté une sensibilité aux trois extraits étudiés, à partir de 50 mg/ml (**Figure 11.b**), avec des inhibitions élevées de 53-64.77%. L'extrait par Soxhlet a montré l'activité la plus marquée à 100 mg/ml (71.28± 3.05%), suivi par l'extrait de macération (69.65±1.41%), tandis que l'infusion a été légèrement moins efficace (60.54 ± 0.69%).

Ce qui confirme que *C. albicans* est sensible aux métabolites secondaires présents dans la pelure de grenade, suffisamment concentrés. Ces résultats confirment que l'effet antifongique des extraits de pelure de grenade est sélectif, ciblant essentiellement les levures comme *C. albicans* tout en étant inefficace contre les champignons filamenteux dans les conditions expérimentales de cette étude.

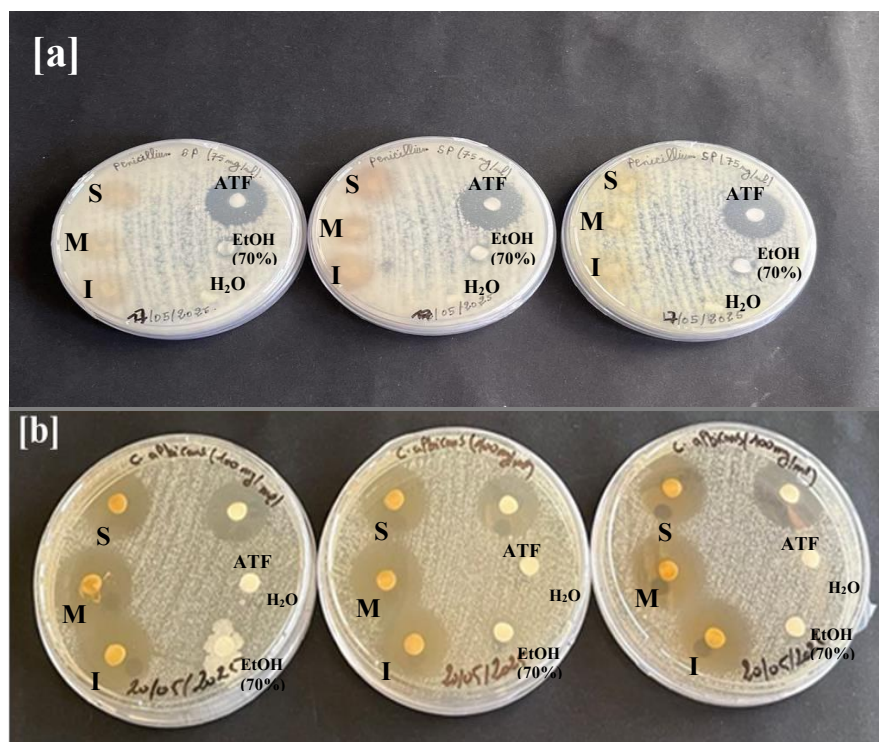


Figure 11 : Zones d'inhibition de la croissance des souches fongiques par les différents extraits de la pelure de grenade. (M : Macération ; S : Soxhlet ; I : Infusion ; ATB : Antibiotique ; ATF : Antifongique ; EtOH (70%) : éthanol 70%).

Ces résultats sont en partie comparables à ceux rapportés par plusieurs études, qui confirment l'absence d'activité antifongique des extraits de pelure de grenade envers les champignons filamenteux. Une étude de (Al-Zoreky, 2009) a montré que l'extrait aqueux de pelure de grenade n'avait aucun effet inhibiteur sur *Aspergillus niger*. Des résultats similaires rapportés par (Sehari et al., 2022) ont également montré une absence d'effet antifongique sur *Aspergillus niger* par des extraits aqueux et alcooliques de pelure, confirmant la résistance de ces moisissures filamenteuses.

Ces données corroborent nos observations, où *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. et *Alternaria* sp. Se sont montrés totalement résistants, quelle que soit l'extrait utilisé. Concernant *Candida albicans*, nos résultats rejoignent ceux de (Colombari et al., 2022), qui ont montré une inhibition marquée par des extraits de pelure de grenade. Cette efficacité pourrait être attribuée à la richesse de ces extraits en polyphénols, capables de former des complexes avec les protéines de la paroi cellulaire fongique, entraînant une lyse cellulaire (Akhtar et al., 2015; Chen et al., 2021). Ces données soulignent le caractère sélectif de l'activité antifongique des extraits de pelure de grenade, plus efficaces contre les levures dans les conditions expérimentales appliquées dans notre étude.

V.2. Méthode de diffusion en milieu liquide

Les résultats de l'analyse antifongique en milieu liquide concernant les extraits de pelure de grenade sont présentés dans le tableau II (**Annexe II**). L'ensemble des extraits obtenus par Soxhlet, macération et infusion ont montré une activité antifongique marquée par la méthode de diffusion en milieu liquide (**Figure 12**). Les résultats obtenus montrent que toutes les souches fongiques testées (*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. et *Alternaria* sp.) sont sensibles aux extraits de pelure de grenade, quelle que soit la méthode d'extraction utilisée, avec des pourcentages d'inhibition allant globalement de 18 % à plus de 89 %.

Pour *Aspergillus niger*, les taux d'inhibition ont atteint en moyenne 78% à 10 mg/ml par l'extrait d'infusion, et ont dépassé 80% à 25 mg/ml, traduisant une activité marquée dès les plus faibles concentrations testées pour cette méthode. L'extrait Soxhlet a montré une efficacité croissante avec la concentration, atteignant 75 % à 25 mg/ml, tandis que la macération affiche des inhibitions plus modérées, autour de 54 % à la même concentration. En ce qui concerne *Penicillium* sp., les extraits d'infusion présentent les inhibitions les plus élevées, dépassant 86 % dès 5 mg/ml, et atteignant environ 88 % à 25 mg/ml. L'extrait Soxhlet montre des taux d'inhibition moyens de 53-64 % selon la concentration testée. La macération présente des résultats plus variables avec des inhibitions comprises entre 36-63 % jusqu'à 25 mg/ml. Pour *Alternaria* sp., l'extrait d'infusion s'est révélé particulièrement efficace, avec une inhibition atteignant 81% à 5 mg/ml, 86% à 10 mg/ml et plus de 89% à 25 mg/ml. L'extrait par Soxhlet a également montré une bonne activité à faible dose (71 % à 5 mg/ml). La macération a donné des inhibitions allant de 18 % à environ 71% selon la concentration.

Aux concentrations élevées (75-100 mg/ml) de certains extraits, les mesures ont affiché un dépassement de l'absorbance, indiquant une croissance fongique excessive. Ce phénomène a été rapporté dans des études antérieures, notamment lorsque des extraits riches en tanins sont testés à des doses élevées (Mashile et al., 2024; Wu et al., 2025).

La levure *Candida albicans* s'est révélée plus sensible que les autres souches fongiques, avec des inhibitions supérieures à 80 % à 100 mg/ml pour l'extrait par infusion ($82.46 \pm 0.83\%$), par Soxhlet ($84.74 \pm 2.12\%$) et par macération ($95.18 \pm 2.77\%$). Ceci est en faveur d'un effet dose-dépendant sur la souche *C. albicans*.

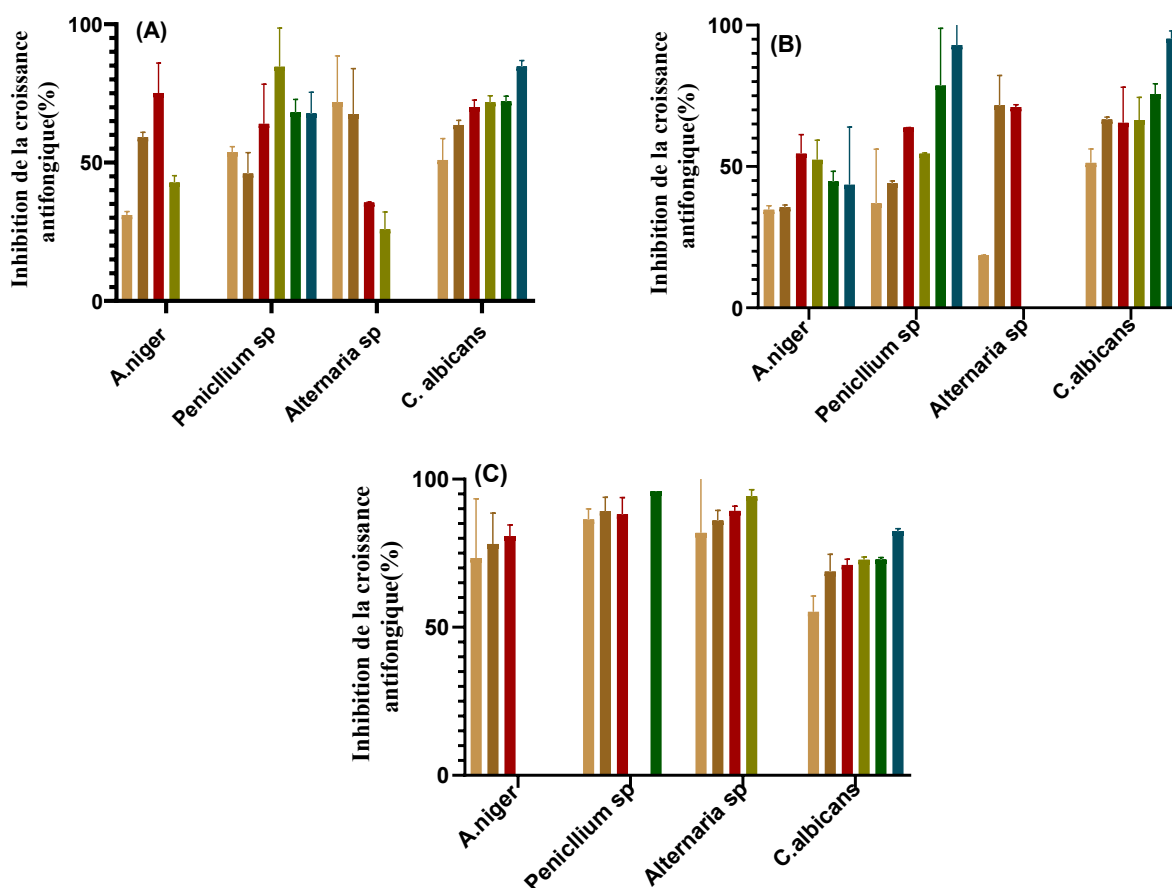


Figure 12 : Pourcentages d'inhibition de la croissance des souches fongiques testées par les différents extraits de la pelure de grenade. A) Soxhlet, B) Macération, C) Infusion.

Comparés aux bactéries, les champignons filamenteux *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* et *Alternaria sp.* ont montré une sensibilité globale plus faible aux extraits de pelure de grenade, avec des taux d'inhibition marqués seulement à des concentrations élevées. Dans l'ensemble, l'extrait obtenu par infusion a conduit aux meilleurs taux d'inhibition, en particulier contre *A. niger* et *C. albicans*, où des inhibitions supérieures à 85% ont été observées dès 10 mg/ml et à 100 mg/ml respectivement. Ceci traduit une meilleure efficacité des composés hydrosolubles contenus dans cet extraits (Sarbaswarup et al., 2019) Mashile *et al.*, 2024).

À l'inverse, une variabilité importante d'efficacité selon la méthode d'extraction et la concentration testée a été observée sur *Penicillium sp.* et *Alternaria sp.* Cette efficacité fongicide relativement limitée, surtout aux faibles concentrations, pourrait s'expliquer par la barrière structurale que représente la paroi épaisse des champignons filamenteux, riche en β -1,3/ β -1,6-glucanes et chitines, qui forme une barrière physique significative empêchant la pénétration des composés bioactifs (Ost et al., 2025). L'extrait Soxhlet, bien que moins performant par rapport aux deux autres extraits, a montré une inhibition notable sur *A. niger* ($75.20 \pm 10.81\%$ à 25 m/ml) et *C. albicans* ($84.74 \pm 2.12\%$ à 100 mg/ml) à forte concentration. Ces résultats confirment encore que les composés bioactifs extraits à chaud, jouent un rôle important dans l'activité antifongique.

Ces résultats corroborent les travaux de (Wu et al., 2025), qui ont montré une activité plus marquée des extraits de pelure de grenade envers *A. niger* et *C. albicans* (16 à 20 mm). De même, Mohamad et al. (2020) ont rapporté une zone d'inhibition supérieure à 20 mm pour *A. niger* à une concentration de 25 mg/ml d'extrait éthanolique ainsi (Brighenti et al., 2021) ont démontré pour la première fois que la punicalagine bloque les enzymes topoisomérases I et II chez *C. albicans*. Cette inhibition perturbe la réplication et la réparation de l'ADN fongique, provoquant un arrêt de croissance.

V.3. Détermination de l'effet fongicide/fongistatique des extraits de pelure de grenade

Les résultats de l'évaluation de l'effet fongicide ou fongistatique des extraits de pelure de grenade ont révélé un effet fongistatique lorsqu'il y a reprise de la croissance fongique sur milieu solide après traitement, tandis qu'un effet fongicide est confirmé par l'absence totale de croissance sur milieu solide (**Figure 13**).

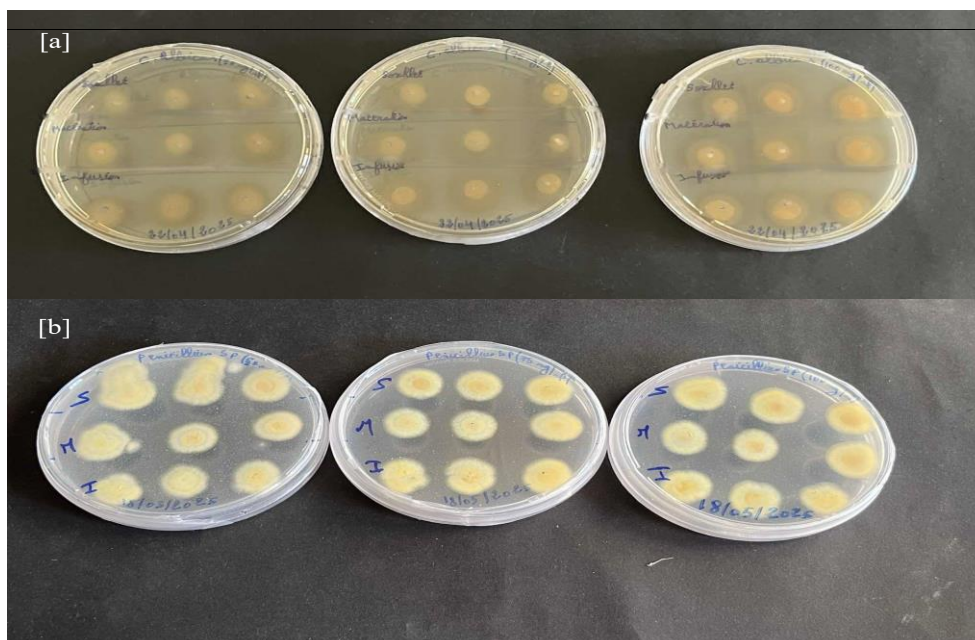


Figure 13 : Résultats de l'analyse de l'effet fongicide/fongistatique des extraits de la pelure sur la croissance fongique.

Dans notre étude, tous les extraits testés (Soxhlet, macération et infusion) ont montré une croissance fongique à toutes les concentrations pour l'ensemble des souches fongiques, à l'exception de *C. albicans*, qui a présenté une croissance visible à 5, 10 et 25 mg/ml (effet fongistatique) (**Figure 13.a**). Cependant, une absence totale de croissance a été observée à partir de 50 jusqu'à 100 mg/ml, des trois extraits utilisés, indiquant un effet fongicide à ces concentrations. Ce résultat a montré une forte sensibilité de *C. albicans* aux extraits de pelure de grenade à doses moyennes et élevées.

Ces observations suggèrent que les extraits de pelure de grenade possèdent une activité fongicide marquée à des concentrations élevées contre *C. albicans*, contrairement aux autres souches fongiques testées qui semblent être résistantes à ces extraits, même à haute dose. Cette différence de sensibilité pourrait être liée à la structure cellulaire des champignons filamenteux (Ost et al., 2025), ou à l'activité des pompes d'efflux présentes dans les champignons filamenteux, qui participent à l'export des composés bioactifs hors des cellules, réduisant leur efficacité (Morschhäuser, 2010).

Des études antérieures ont mis en évidence l'activité antifongique marquée des extraits de pelure de grenade, particulièrement envers *Candida albicans* (Endo et al., 2010b) ont identifié la punicalagine comme principal composé actif, agissant à faible dose contre *C. albicans* avec des CMI de 3.9 mg/ml. Ces résultats sont en accord avec nos observations. Par contre, *Alternaria* sp. n'a montré aucune sensibilité à nos extraits, ce qui est conforme aux données de Glazer *et al.* (2012), montrant une corrélation négative entre les niveaux d'acide gallagique et de punicaline et le taux de croissance de *Alternaria*, indiquant que plus leur concentration augmente, plus l'inhibition du champignon est importante. À l'opposé, nos résultats montrent une résistance totale d'*Aspergillus niger* et *Penicillium* sp. même à 100 mg/ml. De plus, (Nawaz et al., 2025) ont observé que des extraits méthanolique et éthanolique de pelure de grenade ont tous deux inhibé la croissance de tous les champignons testés, notamment. *Colletotrichum gloeosporioides* (12.2 mm), *Rhizopus stolonifer* (12.0 mm) et *Aspergillus niger* (12.5 mm).

Ces résultats soulignent que les extraits de pelure de grenade présentent un potentiel fongicide important envers *C. albicans*, tandis que leur efficacité semble être plus limitée vis-à-vis des moisissures filamenteuses (*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. et *Alternaria* sp.). En plus de la structure particulière de la paroi cellulaire des champignons filamenteux, cette différence de sensibilité pourrait également résulter des variations de composition chimique des extraits, obtenus par différentes méthodes d'extraction ou encore des variétés de grenade utilisées (Nawaz et al., 2025).

Les pelures de grenade (*Punica granatum* L.), considérées pour longtemps comme un simple sous-produit naturel, représentent aujourd'hui une matrice végétale très riche en composés bioactifs, notamment des acides phénoliques, des flavonoïdes et des tanins. Ces composés sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Dans cette étude, trois méthodes d'extraction conventionnelles ont été utilisées, à savoir, l'infusion, la macération et Soxhlet. L'activité antimicrobienne des trois extraits a été analysée afin d'évaluer l'efficacité des composés bioactifs contenus dans la pelure de grenade.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux ont montré que les trois extraits obtenus sont riches en composés phénoliques (240-260 mg EAG/g extrait sec). De plus, des teneurs comparables en flavonoïdes et en tanins hydrolysables ont été enregistrées entre les différents extraits. Par ailleurs, tous les extraits ont démontré une capacité antioxydante marquée, évaluée par le test à l'ABTS•+. Des valeurs maximales ont été obtenues à 0.5 et 1mg/ml, atteignant environ 90%, suggérant une efficacité comparable entre les trois extraits étudiés.

L'activité antimicrobienne, testée contre plusieurs souches bactériennes et fongiques, a révélé une inhibition efficace de la croissance des bactéries Gram-positives, notamment *B. subtilis* et *S. aureus*, qui se sont révélés les plus sensibles (>90% à 25–50 mg/ml). De plus, *K. pneumoniae*, bactérie à Gram-négative, s'est révélée hautement sensible aux différents extraits (85-95%) à 100 mg/ml. Par ailleurs, une activité antifongique variable, selon dose et extrait, a été déterminé envers *C. albicans* (80-95%), qui s'est montrée la plus sensibles par rapport aux autres champignons testés (*A. niger*, *Penicillium* sp. et *Alternaria* sp.). Afin d'expliquer le mécanisme antimicrobien probable des extraits de pelure de grenade, des effets bactéricide/fongicide et bactériostatique/fongistatique ont été également déterminés.

Enfin, les méthodes d'extraction par Soxhlet, macération et infusion ont permis d'obtenir des extraits efficaces, pouvant être une alternative durable pour le développement d'agents antioxydants et antimicrobiens d'origine végétale. En revanche, d'autres voies de recherche restent à explorer en perspective de ce travail :

- Une caractérisation des composés bioactifs contenus dans la pelure de grenade afin d'identifier les molécules responsables de ses activités biologiques.

- Des études supplémentaires pourraient mettre en évidence des interactions entre les composés phénoliques et les membranes microbiennes, permettant d'élucider les mécanismes antimicrobiens probables.
- Une valorisation de ce sous-produit naturel par des applications dans les différents domaines de l'agro-alimentaire, pharmaceutique et para-pharmaceutique.

- Abdealsiede, M.M.S., Alrasheid, A.A., Ali Omar, M.M., Elbashir, A.A., 2020. Antimicrobial and Antioxidant Activity of Pomegranate Peel Extracts Obtained by Sequential Extraction Method. *Asian J Pharm Res Dev* 8, 14–20. <https://doi.org/10.22270/ajprd.v8i2.710>
- Abdel Hafeez, E.H., Ahmed, A.K., 2016. The Efficacy of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel Extract on Experimentally Infected Rats with Blastocystis Spp. *J Infect Dis Preve Med* 4. <https://doi.org/10.4172/2329-8731.1000131>
- Abdulaziz Alqahtani, Alzhraa Ali Mohamed, Irfan Ahmad, Yasser Alraey, Mohammed Asiri, Jonathan Kopel, Mohammed Merae Alshahrani, 2023. Pomegranate peel extract is an effective agent against MDR bacteria. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 69, 6–11. <https://doi.org/10.14715/cmb/2023.69.5.2>
- Adam, O.A.O., Abadi, R.S.M., Ayoub, S.M.H., 2019. The Effect of Extraction method and Solvents on yield and Antioxidant Activity of Certain Sudanese Medicinal Plant Extracts. *J Phytopharmacol* 8, 248–252. <https://doi.org/10.31254/phyto.2019.8507>
- Afonso, A.F., Pereira, O.R., Fernandes, Â., Calhella, R.C., Silva, A.M.S., Ferreira, I.C.F.R., Cardoso, S.M., 2019. Phytochemical Composition and Bioactive Effects of *Salvia africana*, *Salvia officinalis* ‘Icterina’ and *Salvia mexicana* Aqueous Extracts. *Molecules* 24, 4327. <https://doi.org/10.3390/molecules24234327>
- Ain, H.B.U., Tufail, T., Bashir, S., Ijaz, N., Hussain, M., Ikram, A., Farooq, M.A., Saewan, S.A., 2023. Nutritional importance and industrial uses of pomegranate peel: A critical review. *Food Science & Nutrition* 11, 2589–2598. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3320>
- Aires, A., Mota, V.R., Saavedra, M.J., Monteiro, A.A., Simões, M., Rosa, E.A.S., Bennett, R.N., 2009. Initial in vitro evaluations of the antibacterial activities of glucosinolate enzymatic hydrolysis products against plant pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 106, 2096–2105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04181.x>
- Akhtar, S., Ismail, T., Fraternale, D., Sestili, P., 2015. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry* 174, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.035>
- Alexandre, E.M.C., Silva, S., Santos, S.A.O., Silvestre, A.J.D., Duarte, M.F., Saraiva, J.A., Pintado, M., 2019. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. *Food Research International* 115, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.044>
- Ali, S.A., Alqahtani, N.K., Alnemr, T.M., Saleh, S.M., 2025. Pomegranate peel powder for the sustainable development of a novel date jam: Texture profile, color parameters, microstructure features, antioxidant activity, and sensory properties. *LWT* 217, 117403. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.117403>
- Ali, U., Kumar, P., 2014. Effect of soxhlet and ultrasound assisted extraction on antioxidant activity of pomegranate peel extract 3, 256–270.
- Al-Muammar, M.N., Khan, F., 2012. Obesity: The preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). *Nutrition* 28, 595–604. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.11.013>

- Al-Zoreky, N.S., 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology* 134, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.002>
- Amrutesh, S., 2011. dentistry et ayurveda: An evidence_based approach 2, 3–9.
- An Overview of Pomegranate Peel: A Waste Treasure for Antiviral Activity, 2022. . *TJNPR* 6, 15–19. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v6i1.3>
- Andrés, A.I., Petró, M.J., Adámez, J.D., López, M., Timón, M.L., 2017. Food by-products as potential antioxidant and antimicrobial additives in chill stored raw lamb patties. *Meat Science* 129, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.02.013>
- Antimicrobial activity of ethanolic and aqueous extracts of pomegranate peel against Extended Spectrum Beta-Lactamase producing bacteria, 2019. . *University of Thi-Qar Journal*. <https://doi.org/10.32792/utq/utj/vol12/4/6>
- Arastehfar, A., Gabaldón, T., Garcia-Rubio, R., Jenks, J.D., Hoenigl, M., Salzer, H.J.F., Ilkit, M., Lass-Flörl, C., Perlin, D.S., 2020. Drug-Resistant Fungi: An Emerging Challenge Threatening Our Limited Antifungal Armamentarium. *Antibiotics* 9, 877. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120877>
- Arastehfar, P., 2012. Pomegranate (*Punica granatum* L). Ancient seeds for modern cure? Review of potential therapeutic applications. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis* 2, 171. <https://doi.org/10.4103/2231-0738.99469>
- Balaban, M., Koc, C., Sar, T., Akbas, M.Y., 2021. Antibiofilm effects of pomegranate peel extracts against *B. cereus* , *B. subtilis* , and *E. faecalis*. *Int J of Food Sci Tech* 56, 4915–4924. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15221>
- Balbir-Gurman, A., Fuhrman, B., Braun-Moscovici, Y., Markovits, D., Aviram, M., 2011. Consumption of pomegranate decreases serum oxidative stress and reduces disease activity in patients with active rheumatoid arthritis: a pilot study. *Isr Med Assoc J* 13, 474–479.
- Bourgou, S., SERAIRI, R., MEDINI, F., KSOURI, R., 2016. Effet du solvant et de la methode d' extraction sur la teneur en composés phenoliques et les pontentialités antioxydantes d' euphotbia helioscopia.
- Brighenti, V., Iseppi, R., Pinzi, L., Mincuzzi, A., Ippolito, A., Messi, P., Sanzani, S.M., Rastelli, G., Pellati, F., 2021. Antifungal Activity and DNA Topoisomerase Inhibition of Hydrolysable Tannins from *Punica granatum* L. *IJMS* 22, 4175. <https://doi.org/10.3390/ijms22084175>
- Caballero, V., Estévez, M., Tomás-Barberán, F.A., Morcuende, D., Martín, I., Delgado, J., 2022. Biodegradation of Punicalagin into Ellagic Acid by Selected Probiotic Bacteria: A Study of the Underlying Mechanisms by MS-Based Proteomics. *J. Agric. Food Chem.* 70, 16273–16285. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06585>
- Caliskan, O., Bayazit, S., 2012. Phytochemical and antioxidant attributes of autochthonous Turkish pomegranates. *Scientia Horticulturae* 147, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.08.032>
- Çam, M., Hışıl, Y., 2010. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry* 123, 878–885. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.011>

- Chen, X., Zhang, H., Li, J., Chen, L., 2021. Analysis of chemical compounds of pomegranate peel polyphenols and their antibacterial action against *Ralstonia solanacearum*. *South African Journal of Botany* 140, 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.03.021>
- Colombari, B., Tagliazucchi, D., Odorici, A., Pericolini, E., Foltran, I., Pinetti, D., Meto, A., Peppoloni, S., Blasi, E., 2022. Pomegranate Extract Affects Fungal Biofilm Production: Consumption of Phenolic Compounds and Alteration of Fungal Autoinducers Release. *IJERPH* 19, 14146. <https://doi.org/10.3390/ijerph192114146>
- Darabinia, M., Ranjbar, M., Heidari Gorji, A.M., 2016. Relationship Between Emotional Intelligence and Job Motivation Among Faculty Staff in Mazandaran University of Medical Sciences, Iran. *Iran J Psychiatry Behav Sci* 11. <https://doi.org/10.5812/ijpbs.8065>
- Debib, A., Menadi, S., Sahnouni, F., Boukhatem, M.N., Ouahchia, C., Kaced, A., 2022. BACTERIAL INHIBITORY EFFECT OF ALGERIAN POMEGRANATE (*Punica Granatum* L.) EXTRACTS (PEEL, JUICE, AND SEED) AGAINST MULTIDRUG RESISTANT BACTERIA. *J microb biotech food sci* 11, e4622. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.4622>
- Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., Ju, Y.-H., 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis* 22, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Dong, J.-W., Cai, L., Xing, Y., Yu, J., Ding, Z.-T., 2015. Re-evaluation of ABTS•+ Assay for Total Antioxidant Capacity of Natural Products. *Natural Product Communications* 10, 1934578X1501001239. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501001239>
- Drevelegka, I., Goula, A.M., 2020. Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* 149, 107845. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.107845>
- Eghbali, S., Askari, S.F., Avan, R., Sahebkar, A., 2021. Therapeutic Effects of *Punica granatum* (Pomegranate): An Updated Review of Clinical Trials. *Journal of Nutrition and Metabolism* 2021, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2021/5297162>
- El-Beltagi, H.S., Ragab, M., Osman, A., El-Masry, R.A., Alwutayd, K.M., Althagafi, H., Alqahtani, L.S., Alazragi, R.S., Alhajri, A.S., El-Saber, M.M., 2024. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles via neem extract and their anticancer and antibacterial activities. *PeerJ* 12, e17588. <https://doi.org/10.7717/peerj.17588>
- Elfalleh, W., Tlili, N., Nasri, N., Yahia, Y., Hannachi, H., Chaira, N., Ying, M., Ferchichi, A., 2011. Antioxidant Capacities of Phenolic Compounds and Tocopherols from Tunisian Pomegranate (*Punica granatum*) Fruits. *Journal of Food Science* 76. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02179.x>
- El-Kady, A.M., Abdel-Rahman, I.A.M., Fouad, S.S., Allemailem, K.S., Istivan, T., Ahmed, S.F.M., Hasan, A.S., Osman, H.A., Elshabrawy, H.A., 2021. Pomegranate Peel Extract Is a Potential Alternative Therapeutic for Giardiasis. *Antibiotics* 10, 705. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060705>
- Elkahoui, S., Jamal, A., Ben Abbes, W., Gzara, L., Charradi, K., Haddaji, N., Kachout, M., Abdelgadir, A., Bardakci, F., Badraoui, R., 2024. Investigation of the Valorization of Methanolic Extract of *Punica granatum* L. Peel in Terms of Phytochemical, Trace Element, Antioxidant Activities and ADMET

- Profile of Active Compounds. Pol. J. Environ. Stud. 33, 2587–2602. <https://doi.org/10.15244/pjoes/175022>
- Elkoraichi, I., Moiré, N., Rais, S., Dimier-Poisson, I., Daoudi, F., Debierre-Grockiego, F., 2025. Extracts of food and medicinal plants sold in Moroccan markets induce apoptosis-like in *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. *Scientific African* 27, e02529. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02529>
- Endo, E.H., Garcia Cortez, D.A., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., 2010. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Research in Microbiology* 161, 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.002>
- Fawole, O.A., Makunga, N.P., Opara, U.L., 2012. Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complement Altern Med* 12, 200. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-200>
- Feng, Y., Lin, J., He, G., Liang, L., Liu, Q., Yan, J., Yao, Q., 2022. Compositions and Biological Activities of Pomegranate Peel Polyphenols Extracted by Different Solvents. *Molecules* 27, 4796. <https://doi.org/10.3390/molecules27154796>
- Fischer, U.A., Carle, R., Kammerer, D.R., 2011. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. *Food Chemistry* 127, 807–821. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.156>
- Foss, S.R., Nakamura, C.V., Ueda-Nakamura, T., Cortez, D.A., Endo, E.H., Dias Filho, B.P., 2014. Antifungal activity of pomegranate peel extract and isolated compound punicalagin against dermatophytes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 13, 32. <https://doi.org/10.1186/s12941-014-0032-6>
- Free, S.J., 2013. Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis, in: *Advances in Genetics*. Elsevier, pp. 33–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6>
- Ge, S., Duo, L., Wang, J., GegenZhula, Yang, J., Li, Z., Tu, Y., 2021. A unique understanding of traditional medicine of pomegranate, *Punica granatum* L. and its current research status. *Journal of Ethnopharmacology* 271, 113877. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113877>
- George, N.S., Cheung, L., Luthria, D.L., Santin, M., Dawson, H.D., Bhagwat, A.A., Smith, A.D., 2019. Pomegranate peel extract alters the microbiome in mice and dysbiosis caused by *Citrobacter rodentium* infection. *Food Science & Nutrition* 7, 2565–2576. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1106>
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M.J., 2005. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1370–1373. <https://doi.org/10.1021/jf048396b>
- ghalem, B.R., Bnali, mohamed, 2021. phenolic compounds: structures and activities.
- Ghavipour, M., Sotoudeh, G., Tavakoli, E., Mowla, K., Hasanzadeh, J., Mazloom, Z., 2017. Pomegranate extract alleviates disease activity and some blood biomarkers of inflammation and oxidative stress in Rheumatoid Arthritis patients. *Eur J Clin Nutr* 71, 92–96. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2016.151>
- Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A., 2000. Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4581–4589. <https://doi.org/10.1021/jf000404a>

- Glazer, I., Masaphy, S., Marciano, P., Bar-Ilan, I., Holland, D., Kerem, Z., Amir, R., 2012. Partial Identification of Antifungal Compounds from *Punica granatum* Peel Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4841–4848. <https://doi.org/10.1021/jf300330y>
- Gouda, M., Moustafa, A., Hussein, L., Hamza, M., 2015. Three week dietary intervention using apricots, pomegranate juice or/and fermented sour sobya and impact on biomarkers of antioxidative activity, oxidative stress and erythrocytic glutathione transferase activity among adults. *Nutr J* 15, 52. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0173-x>
- Gow, N.A.R., Latge, J.-P., Munro, C.A., 2017. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr* 5, 5.3.01. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>
- Grillo, G., Capaldi, G., Radošević, K., Jakopović, Ž., Markov, K., Brncic, M., Gallina, L., Calcio Gaudino, E., Cravotto, G., 2023. Unlocking the Bioactive Potential of Pomegranate Peels: A Green Extraction Approach. *Antioxidants* 12, 1796. <https://doi.org/10.3390/antiox12101796>
- Guerrero-Solano, J.A., Jaramillo-Morales, O.A., Jiménez-Cabrera, T., Urrutia-Hernández, T.A., Chehue-Romero, A., Olvera-Hernández, E.G., Bautista, M., 2020. *Punica protopunica* Balf., the Forgotten Sister of the Common Pomegranate (*Punica granatum* L.): Features and Medicinal Properties—A Review. *Plants* 9, 1214. <https://doi.org/10.3390/plants9091214>
- Gullón, P., Astray, G., Gullón, B., Tomasevic, I., Lorenzo, J.M., 2020. Pomegranate Peel as Suitable Source of High-Added Value Bioactives: Tailored Functionalized Meat Products. *Molecules* 25, 2859. <https://doi.org/10.3390/molecules25122859>
- Gulube, Z., Patel, M., 2016. Effect of *Punica granatum* on the virulence factors of cariogenic bacteria *Streptococcus mutans*. *Microbial Pathogenesis* 98, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.027>
- Guo, C., Wei, J., Yang, J., Xu, J., Pang, W., Jiang, Y., 2008. Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nutrition Research* 28, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2007.12.001>
- Haidari, M., Ali, M., Ward Casscells, S., Madjid, M., 2009. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine* 16, 1127–1136. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.06.002>
- haj, ali, Mayadah, A., bassam, 2018. In vitro antibacterial effects of pomegranate fruit peel infusion against two diarrheagenic bacteria.
- Hanafy, S.M., Abd El-Shafea, Y.M., Saleh, W.D., Fathy, H.M., 2021. Chemical profiling, in vitro antimicrobial and antioxidant activities of pomegranate, orange and banana peel-extracts against pathogenic microorganisms. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19, 80. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00151-0>
- Holland, D., Hatib, K., Bar-Ya'akov, I., 2009. Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding, in: Janick, J. (Ed.), *Horticultural Reviews*. Wiley, pp. 127–191. <https://doi.org/10.1002/9780470593776.ch2>
- Hosseini, B., Saedisomeolia, A., Wood, L.G., Yaseri, M., Tavasoli, S., 2016. Effects of pomegranate extract supplementation on inflammation in overweight and obese individuals: A randomized controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 22, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2015.12.003>

- hussein, R., abdul, basma, hussein, hasan, 2019. Antimicrobial activity of ethanolic and aqueous extracts of pmgranate peel againt extended spectrum beta-Lactamase producing bacteria.
- Ifora Ifora, nourkholis, H., kardela, widya, 2020. Cyclooxygenase-2 inhibitory effect and anti-inflammatory activity of pomegranate (punica granatumL) Rind Extract 5, 17–22.
- Islam, M.T., Sarkar, C., El-Kersh, D.M., Jamaddar, S., Uddin, S.J., Shilpi, J.A., Mubarak, M.S., 2020. Natural products and their derivatives against coronavirus: A review of the non-clinical and pre-clinical data. *Phytotherapy Research* 34, 2471–2492. <https://doi.org/10.1002/ptr.6700>
- Ismail, T., Sestili, P., Akhtar, S., 2012. Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology* 143, 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.004>
- Jing, T., Liao, J., Shen, K., Chen, X., Xu, Z., Tian, W., Wang, Y., Jin, B., Pan, H., 2019. Protective effect of urolithin a on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice via modulation of inflammation and oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology* 129, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.031>
- Juneja, V.K., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U., Mukhopadhyay, S., Friedman, M., 2016. Effect of pomegranate powder on the heat inactivation of Escherichia coli O104:H4 in ground chicken. *Food Control* 70, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.027>
- Kaderides, K., Goula, A.M., 2019. Encapsulation of pomegranate peel extract with a new carrier material from orange juice by-products. *Journal of Food Engineering* 253, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.019>
- Kaderides, K., Mourtzinou, I., Goula, A.M., 2020. Stability of pomegranate peel polyphenols encapsulated in orange juice industry by-product and their incorporation in cookies. *Food Chemistry* 310, 125849. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125849>
- Kalaycıoğlu, Z., Erim, F.B., 2017. Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide. *Food Chemistry* 221, 496–507. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.084>
- Karimi, M., Sadeghi, R., Kokini, J., 2017. Pomegranate as a promising opportunity in medicine and nanotechnology. *Trends in Food Science & Technology* 69, 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.019>
- Kharchoufi, H.E., Azlan, A., Tang, S.T., Lim, S.M., 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research* 61, 1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- Ko, K., Dadmohammadi, Y., Abbaspourrad, A., 2021. Nutritional and Bioactive Components of Pomegranate Waste Used in Food and Cosmetic Applications: A Review. *Foods* 10, 657. <https://doi.org/10.3390/foods10030657>
- Kulkarni, A.P., Aradhya, S.M., 2005. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chemistry* 93, 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.029>

- Kumar, A., 2021. COVID-19: Epidemiology, Case Fatalities and the Adversaries within. *Indian Journal of Critical Care Medicine* 25, 603–605. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10071-23869>
- Kupnik, K., Leitgeb, M., Primožič, M., Postružnik, V., Kotnik, P., Kučuk, N., Knez, Ž., Marevci, M.K., 2022. Supercritical Fluid and Conventional Extractions of High Value-Added Compounds from Pomegranate Peels Waste: Production, Quantification and Antimicrobial Activity of Bioactive Constituents. *Plants* 11, 928. <https://doi.org/10.3390/plants11070928>
- Li, H.-B., Jiang, Y., Wong, C.-C., Cheng, K.-W., Chen, F., 2007. Evaluation of two methods for the extraction of antioxidants from medicinal plants. *Anal Bioanal Chem* 388, 483–488. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1235-x>
- Liu, H., Zhu, W., Zou, Y., Xia, X., 2024. Antimicrobial Activity and Mechanisms of Punicalagin against *Vibrio parahaemolyticus*. *Foods* 13, 1366. <https://doi.org/10.3390/foods13091366>
- Lobiuc, A., Pavăl, N.-E., Mangalagiu, I.I., Gheorghită, R., Teliban, G.-C., Amăriucăi-Mantu, D., Stoleru, V., 2023. Future Antimicrobials: Natural and Functionalized Phenolics. *Molecules* 28, 1114. <https://doi.org/10.3390/molecules28031114>
- Lu, J., Ding, K., Yuan, Q., 2008. Determination of Punicalagin Isomers in Pomegranate Husk. *Chroma* 68, 303–306. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0699-y>
- Lu, X., Ye, Z., Jiang, L., Wen, L., Liu, J., Cui, Q., 2024. UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis of pomegranate peel polyphenols and preliminary study on the biosynthesis of ellagic acid and flavonoids. *B* 4, 0–0. <https://doi.org/10.48130/bpr-0024-0031>
- Lysiuk, R., Hudz, N., 2017. Spectrophotometric methods for flavonoid determination in medicinal plants 9, 102–106.
- Magangana, T.P., Makunga, N.P., Amos Fawole, O., Opara, U.L., 2021. Effect of Solvent Extraction and Blanching Pre-Treatment on Phytochemical, Antioxidant Properties, Enzyme Inactivation and Antibacterial Activities of ‘Wonderful’ Pomegranate Peel Extracts. *Processes* 9, 1012. <https://doi.org/10.3390/pr9061012>
- Magangana, T.P., Makunga, N.P., Fawole, O.A., Opara, U.L., 2020. Processing Factors Affecting the Phytochemical and Nutritional Properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Waste: A Review. *Molecules* 25, 4690. <https://doi.org/10.3390/molecules25204690>
- Malak Eddebbagh, Mouhcine Massoudi, Abdelmjid Abourriche, Mohamed Berrada, Mohamed Attaleb, Laïla Benbacer, Ahmed Bennamara, 2016. Correlation of the Cytotoxic and Antioxidant Activities of Moroccan Pomegranate (*Punica Granatum*) with Phenolic and Flavonoid Contents. *JPP* 4. <https://doi.org/10.17265/2328-2150/2016.09.006>
- Malviya, S., Arvind, Jha, A., Hettiarachchy, N., 2014. Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *J Food Sci Technol* 51, 4132–4137. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0956-4>
- Marra, F., Petrovicova, B., Canino, F., Maffia, A., Mallamaci, C., Muscolo, A., 2022. Pomegranate Wastes Are Rich in Bioactive Compounds with Potential Benefit on Human Health. *Molecules* 27, 5555. <https://doi.org/10.3390/molecules27175555>

- Mashile, B., Setlhodi, R., Izu, G.O., Erukainure, O.L., Mashele, S.S., Makhafola, T.J., Eze, K.C., Chukwuma, C.I., 2024. Temperature-dependent extraction and chromatographic recovery and characterisation of ellagitannins with potent antioxidant and glycaemic control properties from ‘Wonderful’ pomegranate peel. *Int J of Food Sci Tech* 59, 408–424. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16823>
- Melgarejo, P., Arts, F., 2000. Total lipid content and fatty acid composition of oilseed from lesser known sweet pomegranate clones. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1452–1454. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200008\)80:10<1452::AID-JSFA665>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200008)80:10<1452::AID-JSFA665>3.0.CO;2-L)
- Melgarejo, P., Núñez-Gómez, D., Legua, P., Martínez-Nicolás, J.J., Almansa, M.S., 2020. Pomegranate (*Punica granatum* L.) a dry pericarp fruit with fleshy seeds. *Trends in Food Science & Technology* 102, 232–236. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.014>
- Meziani, S., L., L., Menadi, N., Tehami, W., 2019. Evaluation of bioactive properties and antioxidant capacity of native and imported pomegranate fruit bark (*Punica granatum*, L) cultivars found in Algeria 8, 1–14.
- Michel, T., Destandau, E., Le Floch, G., Lucchesi, M.E., Elfakir, C., 2012. Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chemistry* 131, 754–760. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.029>
- Mo, Y., Ma, J., Gao, W., Zhang, L., Li, Jiangui, Li, Jingming, Zang, J., 2022. Pomegranate Peel as a Source of Bioactive Compounds: A Mini Review on Their Physiological Functions. *Front. Nutr.* 9, 887113. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.887113>
- Moga, M.A., Dimienescu, O.G., Bălan, A., Dima, L., Toma, S.I., Bîgiu, N.F., Blidaru, A., 2021. Pharmacological and Therapeutic Properties of *Punica granatum* Phytochemicals: Possible Roles in Breast Cancer. *Molecules* 26, 1054. <https://doi.org/10.3390/molecules26041054>
- Mohamad, S., 2020. Inhibition of *Aspergillus niger* by Application of *Punica granatum* Peels and *Cucurbita maxima* Seeds as Bio-fungicide. *Sci. Lett.* 14, 97. <https://doi.org/10.24191/sl.v14i2.9546>
- Morschhäuser, J., 2010. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* 47, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.08.002>
- Mphahlele, Rebogile R, Caleb, O.J., Fawole, O.A., Opara, U.L., 2016. Effects of different maturity stages and growing locations on changes in chemical, biochemical and aroma volatile composition of ‘Wonderful’ pomegranate juice. *J Sci Food Agric* 96, 1002–1009. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7186>
- Mphahlele, Rebogile R., Fawole, O.A., Makunga, N.P., Opara, U.L., 2016. Effect of drying on the bioactive compounds, antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. *BMC Complement Altern Med* 16, 143. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1132-y>
- Muhammad, A., Dayisoylu, K.S., Pei, J., Khan, M.R., Salman, M., Ahmad, R., Ullah, H., Noor, G.R., 2023. Compositional analysis of natural pomegranate peel powder dried by different methods and nutritional and sensory evaluation of cookies fortified with pomegranate peel powder. *Front. Nutr.* 10, 1118156. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1118156>
- Nawaz, M., Pan, J., Liu, H., Umer, M.J., Liu, J., Yang, W., Lv, Z., Zhang, Q., Jiao, Z., 2025. Integrated evaluation of antifungal activity of pomegranate peel polyphenols against a diverse range of postharvest fruit pathogens. *Bioresour. Bioprocess.* 12, 34. <https://doi.org/10.1186/s40643-025-00874-9>

- Németh, J., Oesch, G., Kuster, S., 2015. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics: A challenge for laboratory and clinical practice. <https://doi.org/2015>
- Newton, K., Dixit, V.M., 2012. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 4, a006049–a006049. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006049>
- Nikaido, H., 2003. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. Microbiol Mol Biol Rev 67, 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>
- Omer, H.A.A., Abdel-Magid, S.S., Awadalla, I.M., 2019. Nutritional and chemical evaluation of dried pomegranate (*Punica granatum* L.) peels and studying the impact of level of inclusion in ration formulation on productive performance of growing Ossimi lambs. Bull Natl Res Cent 43, 182. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0245-0>
- Orhan, E., Ercisli, S., Esitken, A., Sengul, M., 2014. Molecular and morphological characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes sampled from Coruh Valley in Turkey. Genet. Mol. Res. 13, 6375–6382. <https://doi.org/10.4238/2014.January.14.4>
- Ost, K.J., Student, M., Cord-Landwehr, S., Moerschbacher, B.M., Ram, A.F.J., Dirks-Hofmeister, M.E., 2025. Cell walls of filamentous fungi – challenges and opportunities for biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol 109, 125. <https://doi.org/10.1007/s00253-025-13512-3>
- Panichayupakaranant, P., Tewtrakul, S., Yuenyongsawad, S., 2010. Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised pomegranate rind extract. Food Chemistry 123, 400–403. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.054>
- Pankey, G.A., Sabath, L.D., 2004. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. CLIN INFECT DIS 38, 864–870. <https://doi.org/10.1086/381972>
- Pérez, M., Dominguez-López, I., Lamuela-Raventós, R.M., 2023. The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. J. Agric. Food Chem. 71, 17543–17553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., Núñez, M.J., 2005. Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace. J. Agric. Food Chem. 53, 2111–2117. <https://doi.org/10.1021/jf0488110>
- Qu, W., Pan, Z., Ma, H., 2010. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. Journal of Food Engineering 99, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.020>
- Rahimi, H.R., Arastoo, M., Ostad, S.N., 2012. A Comprehensive Review of *Punica granatum* (Pomegranate) Properties in Toxicological, Pharmacological, Cellular and Molecular Biology Researches. IJPR 11. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2012.1148>
- Ranjha, M.M.A.N., Amjad, S., Ashraf, S., Khawar, L., Safdar, M.N., Jabbar, S., Nadeem, M., Mahmood, S., Murtaza, M.A., 2020. Extraction of Polyphenols from Apple and Pomegranate Peels Employing Different Extraction Techniques for the Development of Functional Date Bars. International Journal of Fruit Science 20, S1201–S1221. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1782804>

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rodríguez-Moreno, M., Legaz, I., 2025. Molecular Insights into the Interaction of Cathepsin D and Iron in Chronic Wound Healing: Exploring Therapeutic Potential and Mechanisms. *Biomedicines* 13, 544. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13030544>
- Rummun, N., Somanah, J., Ramsaha, S., Bahorun, T., Neergheen-Bhujun, V.S., 2013. Bioactivity of Nonedible Parts of *Punica granatum* L.: A Potential Source of Functional Ingredients. *International Journal of Food Science* 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/602312>
- S., S., K., S., James, J., 2018. A novel chalcone derivative from *Punica granatum* peel inhibits LOX/COX enzyme activity. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 7, 593–597. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.07.001>
- Saini, N., Anmol, A., Kumar, S., Wani, A.W., Bakshi, M., Dhiman, Z., 2024. Exploring phenolic compounds as natural stress alleviators in plants- a comprehensive review. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 133, 102383. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102383>
- Salim, A., Deiana, P., Fancello, F., Molinu, M.G., Santona, M., Zara, S., 2023. Antimicrobial and antibiofilm activities of pomegranate peel phenolic compounds: Varietal screening through a multivariate approach. *Journal of Bioresources and Bioproducts* 8, 146–161. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2023.01.006>
- Sarbaswarup, G., Jayanta Kumar, C., Banti, C., 2019. Comparison of different aqueous extraction methods for optimum extraction of polyphenols and in-vitro antioxidant activity from pomegranate peel 8, 342–347.
- Saroj, P.L., Kumar, R., 2019. Recent advances in pomegranate production in India-a review. *Annal. of Horticult.* 12, 1. <https://doi.org/10.5958/0976-4623.2019.00010.0>
- Scaglione, E., Sateriale, D., Mantova, G., Di Rosario, M., Continisio, L., Vitiello, M., Pagliarulo, C., Colicchio, R., Pagliuca, C., Salvatore, P., 2024. Antimicrobial efficacy of *Punica granatum* Lythraceae peel extract against pathogens belonging to the ESKAPE group. *Front. Microbiol.* 15, 1383027. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1383027>
- Segar, H.M., Gani, S.A., Khayat, M.E., Rahim, M.B.H.A., 2023. Antioxidant and Antidiabetic Properties of Pectin Extracted from Pomegranate (*Punica granatum*) Peel. *J Biochem Microbiol Biotechnol* 11, 35–40. <https://doi.org/10.54987/jobimb.v1i12.851>
- Sehari, N., Siouda, W., Merinas, L., & Netah, N., s, L.,.& Netah, N., 2022. Phytochemical profile, FTIR studies, antioxidant and antifungal activity of extracts of pomegranate peel (*Punica granatum* L.) 12.
- Shaygannia, E., Bahmani, M., Zamanzad, B., Rafieian-Kopaei, M., 2016. A Review Study on *Punica granatum* L. *J Evid Based Complementary Altern Med* 21, 221–227. <https://doi.org/10.1177/2156587215598039>
- Shukla, M., Gupta, K., Rasheed, Z., Khan, K.A., Haqqi, T.M., 2008. Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (*Punica granatum* L) preferentially inhibit COX2 activity ex vivo and IL-1beta-induced PGE2 production in human chondrocytes i n vitro. *J Inflamm* 5, 9. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-5-9>

- Shukla, P., Bui, P., Levy, S.S., Kowalski, M., Baigelenov, A., Parsons, P., 2025. De-skilling, Cognitive Offloading, and Misplaced Responsibilities: Potential Ironies of AI-Assisted Design, in: Proceedings of the Extended Abstracts of the CHI Conference on Human Factors in Computing Systems. Presented at the CHI EA '25: Extended Abstracts of the CHI Conference on Human Factors in Computing Systems, ACM, Yokohama Japan, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1145/3706599.3719931>
- Siddiqui, S.A., Singh, S., Nayik, G.A., 2024. Bioactive compounds from pomegranate peels - Biological properties, structure–function relationships, health benefits and food applications – A comprehensive review. *Journal of Functional Foods* 116, 106132. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106132>
- Sieniawska, E., Baj, T., 2017. Tannins, in: *Pharmacognosy*. Elsevier, pp. 199–232. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00010-X>
- Sies, H., Jones, D.P., 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Singh, B., Singh, J.P., Kaur, A., Singh, N., 2019. Antimicrobial potential of pomegranate peel: a review. *Int J of Food Sci Tech* 54, 959–965. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13964>
- Singh, J., Kaur, H.P., Verma, A., Chahal, A.S., Jajoria, K., Rasane, P., Kaur, S., Kaur, J., Gunjal, M., Ercisli, S., Choudhary, R., Bozhuyuk, M.R., Sakar, E., Karatas, N., Durul, M.S., 2023. Pomegranate Peel Phytochemistry, Pharmacological Properties, Methods of Extraction, and Its Application: A Comprehensive Review. *ACS Omega* 8, 35452–35469. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c02586>
- Singh, N.V., Patil, P.G., Sowjanya, R.P., Parashuram, S., Natarajan, P., Babu, K.D., Pal, R.K., Sharma, J., Reddy, U.K., 2021. Chloroplast Genome Sequencing, Comparative Analysis, and Discovery of Unique Cytoplasmic Variants in Pomegranate (*Punica granatum* L.). *Front. Genet.* 12, 704075. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.704075>
- Smaoui, S., Hlima, H.B., Mtibaa, A.C., Fourati, M., Sellem, I., Elhadef, K., Ennouri, K., Mellouli, L., 2019. Pomegranate peel as phenolic compounds source: Advanced analytical strategies and practical use in meat products. *Meat Science* 158, 107914. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107914>
- Stover, E., Mercure, E.W., 2007. The Pomegranate: A New Look at the Fruit of Paradise. *horts* 42, 1088–1092. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.5.1088>
- Sugawara, E., Kojima, S., Nikaido, H., 2016. Klebsiella pneumoniae Major Porins OmpK35 and OmpK36 Allow More Efficient Diffusion of β -Lactams than Their Escherichia coli Homologs OmpF and OmpC. *J Bacteriol* 198, 3200–3208. <https://doi.org/10.1128/JB.00590-16>
- Sweidan, N., Abu Rayyan, W., Mahmoud, I., Ali, L., 2023. Phytochemical analysis, antioxidant, and antimicrobial activities of Jordanian Pomegranate peels. *PLoS ONE* 18, e0295129. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0295129>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E.M., Houchens, C.R., Grayson, M.L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N., Aboderin, A.O., Al-Abri, S.S., Awang Jalil, N., Benzonana, N., Bhattacharya, S., Brink, A.J., Burkert, F.R., Cars, O., Cornaglia, G., Dyar, O.J., Friedrich, A.W., Gales, A.C., Gandra, S., Giske, C.G., Goff, D.A., Goossens, H., Gottlieb, T., Guzman Blanco, M., Hryniewicz, W., Kattula, D., Jinks, T., Kanj, S.S., Kerr, L., Kieny, M.-P., Kim, Y.S., Kozlov, R.S., Labarca, J., Laxminarayan, R., Leder, K., Leibovici, L., Levy-Hara, G., Littman, J., Malhotra-Kumar, S., Manchanda, V., Moja, L., Ndoye, B., Pan, A.,

- Paterson, D.L., Paul, M., Qiu, H., Ramon-Pardo, P., Rodríguez-Baño, J., Sanguinetti, M., Sengupta, S., Sharland, M., Si-Mehand, M., Silver, L.L., Song, W., Steinbakk, M., Thomsen, J., Thwaites, G.E., Van Der Meer, J.W., Van Kinh, N., Vega, S., Villegas, M.V., Wechsler-Fördös, A., Wertheim, H.F.L., Wesangula, E., Woodford, N., Yilmaz, F.O., Zorzet, A., 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases* 18, 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tehranifar, A., Selahvarzi, Y., Kharrazi, M., Bakhsh, V.J., 2011. High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Industrial Crops and Products* 34, 1523–1527. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.05.007>
- Tu, P.-W., Chiu, J.-S., Lin, C., Chien, C.-C., Hsieh, F.-C., Shih, M.-C., Yang, Y.-L., 2022. Evaluation of the Antifungal Activities of *Photorhabdus akhurstii* and Its Secondary Metabolites against Phytopathogenic *Colletotrichum gloeosporioides*. *JoF* 8, 403. <https://doi.org/10.3390/jof8040403>
- Valero-Mendoza, A.G., Meléndez-Rentería, N.P., Chávez-González, M.L., Flores-Gallegos, A.C., Wong-Paz, J.E., Govea-Salas, M., Zugasti-Cruz, A., Ascacio-Valdés, J.A., 2023. The whole pomegranate (*Punica granatum* L.), biological properties and important findings: A review. *Food Chemistry Advances* 2, 100153. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100153>
- Van Elswijk, D.A., Schobel, U.P., Lansky, E.P., Irth, H., Van Der Greef, J., 2004. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry* 65, 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.07.001>
- Venat, A., Peticila, A., 2021. pomegranate (*punica granatum*l.)-a source of valuable bioactive compounds with therapeutic properties: a review 124, 43_50.
- Vučić, V., Grabež, M., Trchounian, A., Arsić, A., 2019. Composition and Potential Health Benefits of Pomegranate: A Review. *CPD* 25, 1817–1827. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190708183941>
- Wang, D., Özen, C., Abu-Reidah, I.M., Chigurupati, S., Patra, J.K., Horbanczuk, J.O., Jóźwik, A., Tzvetkov, N.T., Uhrin, P., Atanasov, A.G., 2018. Vasculoprotective Effects of Pomegranate (*Punica granatum* L.). *Front. Pharmacol.* 9, 544. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00544>
- Willis, R.B., 1998. Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. *Analyst* 123, 435–439. <https://doi.org/10.1039/a706862j>
- Wu, W., Mis Solval, K., Chen, J., 2025. Inhibition of *Salmonella enterica* and *Enterohemorrhagic Escherichia coli* by Ethanolic Extracts of Pomegranate Peels. *Microbiology Research* 16, 13. <https://doi.org/10.3390/microbiolres16010013>
- Xuan Cuong, D., Xuan Hoan, N., Huu Dong, D., Thi Minh Thuy, L., Van Thanh, N., Thai Ha, H., Thi Thanh Tuyen, D., Xuan Chinh, D., 2020. Tannins: Extraction from Plants, in: Aires, A. (Ed.), *Tannins - Structural Properties, Biological Properties and Current Knowledge*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86040>
- Yan, L., Cao, Y., Zheng, G., 2017. Optimization of subcritical water extraction of phenolic antioxidants from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel by response surface methodology. *Anal. Methods* 9, 4647–4656. <https://doi.org/10.1039/C7AY01475A>
- Yuan, Z., Fang, Y., Zhang, T., Fei, Z., Han, F., Liu, C., Liu, M., Xiao, W., Zhang, W., Wu, S., Zhang, M., Ju, Y., Xu, H., Dai, H., Liu, Y., Chen, Y., Wang, L., Zhou, J., Guan, D., Yan, M., Xia, Y., Huang, X.,

- Liu, D., Wei, H., Zheng, H., 2018. The pomegranate (*Punica granatum* L.) genome provides insights into fruit quality and ovule developmental biology. *Plant Biotechnology Journal* 16, 1363–1374. <https://doi.org/10.1111/pbi.12875>
- Zahin, M., Aqil, F., Ahmad, I., 2010. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 703, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.08.001>
- Zakzouk, W.S., Mohamed, A.F., Barakat, A., Rabiee, O.A., 2024. Assessment of Pomegranate Peel and Seeds extracts antiviral potential and antioxidant activity against HAV and HSV-1 virus models and related In Silico computational study. *Egypt. J. Chem.* 0, 0–0. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2024.276396.9597>
- Zhang, L., Fu, X., Luo, D., Xing, L., Du, Y., 2021. Musical Experience Offsets Age-Related Decline in Understanding Speech-in-Noise: Type of Training Does Not Matter, Working Memory Is the Key. *Ear & Hearing* 42, 258–270. <https://doi.org/10.1097/AUD.0000000000000921>
- Zuhair Dardona, 2023. Literature Review: *Punica granatum* (pomegranate) with an emphasis on its anti-parasitic activity. *GSC Biol. Pharm. Sci.* 23, 100–114. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2023.23.2.0192>

Composition des milieux de cultures

(Pour 1 litre d'eau distillée) (Le Minor and Richard, 1993)

➤ **Gélose nutritive**

Extrait de viande	01 g
Extrait de levure	02 g
Peptone	05 g
Chlorure de sodium	05 g
Agar	15 g

$pH = 7.0 \pm 0.2$, autoclaver à 120°C pendant 20min.

➤ **Bouillon nutritif**

Extrait de viande	01 g
Extrait de levure	02 g
Peptone	10 g
Chlorure de sodium	05 g

$pH = 7.0 \pm 0.2$, autoclaver à 120°C pendant 20min.

➤ **Gélose Mueller Hinton**

Infusion de viande de bœuf.....	300 ml
Peptone de caséine.....	17.5 g
Amidon de maïs	1.5 g
Agar	10 g

$pH = 7.4 \pm 0.2$, autoclaver à 120°C pendant 20min.

➤ **Bouillon Sabouraud**

Peptone de caséine	5 g
Peptone de viande	5 g
Glucose monohydrate.....	40 g
Chloramphenicol.....	0.5 g

$pH = 5.6 \pm 0.2$, autoclaver à 120°C pendant 20min.

➤ **Gélose extrait de pomme de terre (PDA)**

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g

$pH = 5.6 \pm 0.2$, autoclaver à 120°C pendant 20min.

➤ **Gélose extrait de Malt**

Maltose	12.75 g
Dextrine	2.75 g
Peptone	0.78 g
Agar	15 g

$pH = 4.7 \pm 0.2$, autoclaver à 120°C pendant 20min

Tableau I : Pourcentages d'inhibition de la croissance de diverses souches bactériennes par les différents extraits de pelure de grenade (*Punica granatum* L.) (Soxhlet, Macération, Infusion).

Extrait (mg/ml)		Souches bactériennes (% RIZD)					
		<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhimurium</i>
Soxhlet	5	53.39±2.38	62.65±2.05	50.60±1.52	56.6±0.23	52.44±0.07	50.60±3.75
	10	72.33±2.9	64.20±0.27	81.95±0.87	59.53±2.01	88.28±2.89	81.95±3.20
	25	85.87±8.75	91.09±5.12	92.24±3.26	85.10±5.21	91.96±1.93	92.24±16.18
	50	86.78±0.12	93.73±0.4	90.47±3.09	88.48±1.19	93.11±1.54	90.47±11.25
	75	88.78±3.15	94.75±1.28	88.46±1.71	92.36±0.92	95.95±1.36	88.46±2.22
	100	92.6±3.18	97.22±2.82	64.12±1.8	95.32±0.15	96.76±3.06	64.12±1.36
Macération	5	59.82±1.35	82.78±3.09	63.09±3.36	67.48±1.85	56.46±2.64	38.68±5.91
	10	60.68±3.14	74.73±8.06	77.45±0.40	80.67±3.87	63.98±4.93	60.93±4.22
	25	81.26±0.99	93.44±1.66	86.71±13.60	86.78±3.71	91.88±2.18	75.89±3.99
	50	89.33±3.02	95.56±3.39	90.20±3.49	87.50±3.96	84.61±0.45	86.16±2.46
	75	93.17±1.76	93.67±0.97	92.91±1.36	94.17±3.32	86.02±4.31	73.01±4.21
	100	95.47±0.79	81.66±1.61	92.57±1.37	87.78±7.83	92.60±3.18	66.64±0.86
Infusion	5	73.24±0.12	57.75±1.95	55.03±3.29	66.92±3.21	67.25±1.49	43.98±4.07
	10	86.12±1.57	80.26±2.19	74.63±1.10	74.41±2.35	79.31±2.83	57.22±3.96
	25	93.49±0.48	81.51±2.67	88.90±3.51	85.05±0.92	79.81±1.50	65.65±7.23
	50	96.14±0.96	89.64±2.41	93.53±1.95	85.93±0.19	86.75±2.39	76.21±4.87
	75	86.21±5.44	96.68±2.26	96.51±2.95	86.77±1.11	94.22±2.19	79.92±1.35
	100	84.32±4.65	92.55±2.85	97.45±0.67	95.37±1.04	88.64±1.20	89.53±1.22

Tableau II : Pourcentages d'inhibition de la croissance de diverses souches fongique par les différents extraits de pelure de grenade (*Punica granatum* L.) (Soxhlet, Macération, Infusion).

Extrait (mg/ml)		Souches fongiques (% RIZD)			
		<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
Soxhlet	5	50.96±7.70	31.04±1.32	53.76±2.02	71.86±16.66
	10	63.58±1.72	59.21±1.69	46.03±7.55	67.48±16.48
	25	70.07±2.50	75.20±10.81	64.00±14.36	35.58±0.16
	50	71.88±2.30	42.77±2.54	84.69±13.94	25.89±6.25
	75	72.16±1.85	-	68.20±4.63	-
	100	84.74±2.12	-	67.78±7.66	-
Macération	5	51.30±9.86	34.72±1.41	36.9±19.11	18.53±0.13
	10	72.40±5.04	35.61±0.75	44.03±0.83	71.66±10.58
	25	64.45±12.63	54.53±6.77	63.75±0.07	71.04±0.82
	50	66.43±8.02	52.36±6.89	54.52±0.26	-
	75	75.60±3.69	44.69±3.57	78.60±20.29	-
	100	95.18±2.77	43.56±10.20	92.95±8.43	-
Infusion	5	55.24±9.80	73.34±7.71	86.41±3.56	81.84±10.06
	10	68.80±10.98	78.13±10.44	89.20±4.70	86.07±3.38
	25	71.08±1.87	80.81±3.74	88.14±5.62	89.33±1.56
	50	72.75±0.92	-	-	94.23±2.26
	75	72.88±0.69	-	-	-
	100	82.46±0.83	-	-	-

Résumé

La pelure de grenade (*Punica granatum* L.), considérée comme un sous-produit naturel, est actuellement reconnue comme une source importante de composés bioactifs. Cette étude vise à évaluer l'activité antimicrobienne d'extraits de pelure de grenade préparés par trois méthodes d'extraction conventionnelles ; Soxhlet, macération et infusion. Les extraits ont été d'abord analysés pour leur teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins hydrolysables. Les résultats ont révélé des concentrations élevées en composés phénoliques avec une teneur maximale de 258.88 ± 35.52 mg EAG/g contenu dans l'extrait de macération. Le test de l'activité anti-oxydante à l'ABTS a montré un effet neutralisant significatif ($\sim 90\%$), par les trois extraits étudiés. Par ailleurs, l'activité antimicrobienne envers plusieurs souches bactériennes et fongiques, a été évaluée par les méthodes de diffusion sur milieu gélosé et en milieu liquide. Les extraits ont présenté une activité antimicrobienne variable selon l'extrait, la dose et la souche testée. Enfin, un mécanisme d'action bactéricide/fongicide ou bactériostatique/fongistatique a été mis en évidence pour chaque extrait. L'ensemble de ces résultats confirme l'intérêt de la pelure de grenade comme source potentielle d'agents antimicrobiens naturels.

Mots-clés : *Punica granatum* L., pelure de grenade, polyphénols, activité antibactérienne, activité antifongique.

Abstract

The pomegranate peel (*Punica granatum* L.), considered to be a natural by-product, is currently recognised as an important source of bioactive compounds. The aim of this study was to assess the antimicrobial activity of extracts from pomegranate peel made by three conventional extraction methods: Soxhlet, maceration and infusion. First, the extracts were analysed for their content in total polyphenols, flavonoids and hydrolysable tannins. The results revealed the highest phenolic compounds content (258.88 ± 35.52 mg GAE/g) in the maceration extract. The ABTS antioxidant activity assay showed a strong free radical scavenging effect ($\sim 90\%$), for the three studied extracts. In addition, the antimicrobial activity against a range of bacterial and fungal strains was assessed using diffusion methods on agar and in liquid medium. The antimicrobial activity of the extracts was variable according to the tested dose, the strain, and the extract. Finally, a bactericidal/fungicidal or bacteriostatic/fungistatic mechanism of action were demonstrated for each extract. Taken together, these findings confirm the value of pomegranate peel as a potential source of natural antimicrobial agents.

Keywords : *Punica granatum* L., pomegranate peel, polyphenols, antibacterial activity, anti-fungal activity.

